

糖尿病性腎症モデルラットを用いたプロスタサイクリン誘導体ベラプロストナトリウムの病態進展抑制効果に関する研究

著者	佐藤 奈穂子
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7780号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00143934

糖尿病性腎症モデルラットを用いた
プロスタサイクリン誘導体ベラプロストナトリウムの
病態進展抑制効果に関する研究

2016年1月

佐藤 奈穂子

糖尿病性腎症モデルラットを用いた
プロスタサイクリン誘導体ベラプロストナトリウムの
病態進展抑制効果に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生命産業科学専攻
博士（生物工学） 学位論文

佐藤 奈穂子

目 次

第 1 章	序論	1
1.1	研究の背景	2
1.2	研究の目的	3
第 2 章	非肥満型糖尿病モデルラットの長期飼育により発現した病態の尿・血液パラメータならびに病理組織学的手法を用いた解析とヒト糖尿病性腎症との比較	10
2.1	緒言	11
2.2	材料と方法	12
2.3	結果	14
2.4	考察	16
第 3 章	肥満型糖尿病モデルラットの糖尿病病態進展に伴う尿・血液パラメータならびに病理組織学的変化の解析とヒト糖尿病との比較	29
3.1	緒言	30
3.2	材料と方法	30
3.3	結果	31
3.4	考察	32
第 4 章	糖尿病性腎症モデルラットを用いた BPS の糖尿病ならびに糖尿病性腎症に対する病態進展抑制作用の解析	38
4.1	緒言	39
4.2	材料と方法	41
4.3	結果	44
4.4	考察	48
第 5 章	総括	68
	引用文献	77
	謝辞	88

略語

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ARB	Angiotensin Receptor Blocker
BPS	Beraprost Sodium
BUN	Blood Urea Nitrogen
CKD	Chronic Kidney Disease
C _{max}	Maximum Drug Concentration
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
DRI	Direct Renin Inhibitor
GK	Goto-Kakizaki
HbA1c	Hemoglobin A1c
HDL	High-Density Lipoprotein
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
LDL	Low-Density Lipoprotein
L-NAME	L-N ^G -Nitro-L-Arginine Methyl Ester
NAG	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PG	Prostaglandin
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
SBP	Systolic Blood Pressure
α SMA	α Smooth Muscle Actin
Tcho	Total Cholesterol
TG	Triglyceride
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TP	Total Protein
TX	Thromboxane

第 1 章 序論

1.1 研究の背景

糖尿病は肥満などの生活習慣や遺伝的要因などに起因して発症する慢性疾患である。成人のおよそ 10 %で糖尿病が強く疑われると報告されており^{1),2)}、様々な薬物が開発されているが治癒させることが難しく、重要な健康上の懸念となっている。糖尿病性腎症は糖尿病の 3 大合併症の一つであり 2 型糖尿病患者のおよそ 30~40 %が腎症を発症すると言われている³⁾。糖尿病性腎症も原疾患と同様に有効な治療薬がないため徐々に悪化して腎不全に至り、近年では透析導入患者の原疾患別第 1 位となっている (Table 1-1)⁴⁾。

糖尿病の発症とそれに引き続く糖尿病性腎症の根本的なメカニズムは非常に複雑であり、完全には解明されていない。このため、様々なメカニズムをターゲットとした候補薬の研究が続けられており、新薬のニーズがある領域である。

Figure 1-1 に示すように、腎臓は主に糸球体と尿細管で構成され、糸球体は濾過機能、尿細管は再吸収機能を有する。糸球体は糸球体毛細血管、メサンギウム、糸球体基底膜、足細胞などからなり、輸入細動脈から糸球体を経て濾過された原尿はボウマン嚢で受け止められて尿細管へ移行する。濾過量は輸出入細動脈圧によりコントロールされる。尿細管はタンパク、水分の再吸収や電解質のコントロール機能を有しており、必要な物質を再吸収したのち尿として排泄する⁵⁾。

Figure 1-2 に糖尿病性腎症における腎組織障害の進展について示した。糖尿病に起因した糖尿病性腎症は初期には糸球体メサンギウムが形質転換して基質を増加させ、糸球体基底膜の肥厚もみられる。同時に尿細管間質の初期障害も見られる。病態の進行に伴って糸球体毛細血管障害が進行して硬化がみられ、また、尿細管萎縮、基底膜肥厚、尿細管間質の線維化、炎症性細胞の浸潤などの尿細管間質障害も顕著になって徐々に糸球体濾過能が低下し、最終的には腎不全へ至る⁶⁾⁻⁸⁾。それらの変化に伴って、正常では糸球体から濾過されない高分子タンパク (アルブミンなど) の漏出や尿細管から

のタンパクの再吸収能が低下により尿中タンパクの上昇がみられる⁹⁾⁻¹⁰⁾。さらに糸球体硬化が進行して腎不全になると低分子化合物（BUN、クレアチニンなど）が糸球体より濾過できずに血中濃度が上昇する¹¹⁾。このように、糖尿病性腎症は複雑な過程を経て徐々に病態が進展することが知られている。

本研究で使用したベラプロストナトリウム(BPS)はプロスタサイクリンの誘導体である。プロスタグランジン(PG)は生理活性物質の一種であり、Figure 1-3 に示すように、細胞膜リン脂質から遊離したアラキドン酸より、PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂（プロスタサイクリン）、TXA₂ などが生合成される。このうち、プロスタサイクリンは抗血小板作用、血管平滑筋弛緩作用を有することが知られている^{12), 13)}。しかしながら、化学的に極めて不安定で血漿中消失半減期が短いため、東レ株式会社において実用化のために改良を重ね、世界で初めての経口投与可能な PGI₂ 誘導体としてベラプロストナトリウム(BPS)が開発された。BPS は、「慢性動脈閉塞症に伴う潰瘍、疼痛及び冷感の改善」（1992 年）、「原発性肺高血圧症」（1999 年）の効能・効果について製造販売承認取得した。また、血中濃度の持続化と C_{max} の抑制により、服用回数を減らし、かつ 1 日服用量を増加させることで治療効果の向上を達成したベラプロストナトリウム徐放錠を開発し、「肺動脈性肺高血圧症」の効能・効果について承認を取得した(2007 年)¹⁴⁾。

BPS は血管平滑筋弛緩作用、血管平滑筋増殖抑制作用、内皮保護作用、血小板抑制作用などを有することから^{12), 13)}、前述のような腎障害に対して輸出入細動脈を拡張して糸球体過剰濾過を改善し、糸球体内皮あるいは尿細管間質の毛細血管内皮の障害を軽減し、腎障害に対して総合的に抑制効果を示す可能性が期待された。そこで、新たな領域として、糖尿病性腎症に対する BPS の有用性を評価した。

1.2 研究の目的

BPS の糖尿病性腎症に対する有用性評価の研究方針を決めるにあたり、今まで有効な薬物が見出せていない原因として以下の問題点を取り上げて考察した。

一つ目は、治療対象である糖尿病性腎症の病態進展の複雑さである。前項で述べたように、糖尿病に起因した糖尿病性腎症は、糸球体障害から始まり病態の進行に伴って尿細管の障害もみられるようになり、徐々に糸球体濾過能が低下して腎不全へ至る複雑な過程を経ているため、状態に合わせて複数の薬物を併用しているが十分な効果は得られていない。したがって、それらを総合的に改善させる多様なメカニズムを持つ薬物が必要ではないかと考えた。

二つ目は適切なモデル系による評価の必要性についてである。一般的には糖尿病性腎症治療薬候補のスクリーニング解析は、モデル動物を用いた尿中タンパクや血中クレアチニンなど腎障害関連パラメータを指標とした簡便で短期的な解析が中心である。しかし、これらのパラメータが変動する要因は様々であるため、臨床ではパラメータ解析で腎障害が疑われた場合には腎生検により腎組織障害像を確認し適切な治療薬を選択している⁶⁾。したがって、ヒトで有効性を示す薬物を創出するためには、血液や尿パラメータの推移のみならず、ヒトの腎組織障害像に限りなく近い病態を示すモデルで解析する必要があると考えられた。すなわち、病理組織学的解析の手法を導入し、モデル選択のための最重点項目とすることが重要であると考えた。

本研究では、治療薬のない糖尿病性腎症に対して有効な薬剤を見出すことを目指し、上述の問題点を踏まえて以下の順に検討を進めることとした。

まず、事前に数種のモデル動物について糖尿病性腎症初期の腎組織障害像を調べ、ヒト糖尿病性腎症の組織障害像との類似性が低い動物モデルは除外した。類似性の判断には病理組織学的評価が重要であると考え、モデル系の選択の判断において優先項目とした。除外例として、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットは膵臓ランゲルハンス氏島に障害を与えて高血糖状態にし、腎障害パラメータである尿中タンパクも上昇するが、ヒトで見られるような糸球体硬化や尿細管間質障害⁷⁾がみられないため^{6), 15)}、モデルとして選択しなかった。これらの事前検討の結果、ヒトと類似した腎障害

進展を示すことが期待されるモデル動物 2 種を選定した（第 2 章、第 3 章参照）。

すなわち、腎臓に対する薬物の直接効果を明らかにするため、肥満の要因のない非肥満型モデル **Goto-Kakizaki (GK)** ラット¹⁶⁾を、原疾患である糖尿病に対する作用も合わせて評価できる肥満型モデル **Zucker** ラット¹⁷⁾を選択した。これらのモデルを用いて以下の章に述べるように系の構築とヒトの病態との類似性評価を行った（第 2 章、第 3 章）。次に、選定した動物モデル系を用いて、**BPS** の腎臓領域での有用性を評価した（第 4 章）。最後に総括として、臨床において糖尿病性腎症への治療効果が報告されている市販薬のデータの調査結果より **BPS** との特徴の違いを比較し、**BPS** のヒト糖尿病性腎症治療薬としての有用性を考察した（第 5 章）。

Table 1-1 2013 年末患者の原疾患別人数と平均年齢⁴⁾

(Number of all dialysis patients in 2013 for different primary diseases and their mean age)

原疾患	患者数 (%)		平均年齢	標準偏差
慢性糸球体腎炎	99,029	(32.4)	66.17	12.54
慢性腎盂腎炎	3,049	(1.0)	64.99	13.98
急速進行性糸球体腎炎	2,411	(0.8)	68.54	13.19
妊娠腎／妊娠中毒症	1,657	(0.5)	63.83	10.02
その他分類不能の腎炎	1,335	(0.4)	60.19	16.76
多発性嚢胞腎	10,654	(3.5)	64.70	11.22
腎硬化症	26,428	(8.6)	73.83	11.82
悪性高血圧	2,498	(0.8)	63.96	14.84
糖尿病性腎症	115,118	(37.6)	67.11	11.24
SLE腎炎	2,285	(0.7)	60.27	13.73
アミロイド腎	452	(0.1)	66.69	11.50
痛風腎	1,128	(0.4)	67.03	11.42
先天性代謝異常による腎不全	263	(0.1)	48.92	17.34

原疾患	患者数 (%)		平均年齢	標準偏差
腎・尿路結核	230	(0.1)	72.04	8.87
腎・尿路結石	600	(0.2)	70.54	10.85
腎・尿路腫瘍	854	(0.3)	72.25	10.89
閉塞性尿路障害	750	(0.2)	63.38	17.20
骨髄腫	262	(0.1)	69.78	12.49
腎形成不全	626	(0.2)	43.43	19.02
移植後再導入	2,179	(0.7)	55.77	12.62
その他	7,232	(2.4)	65.16	15.78
不明	26,806	(8.8)	69.50	13.13
合計	305,846	(100.0)	67.20	12.52
記載なし	30	(0.0)	70.64	13.44
総計	305,876	(0.0)	67.20	12.52

数値右のカッコ内は列方向の合計に対する%です。 患者調査による集計

(Values in parentheses represent the percentage relative to the total in each column.)

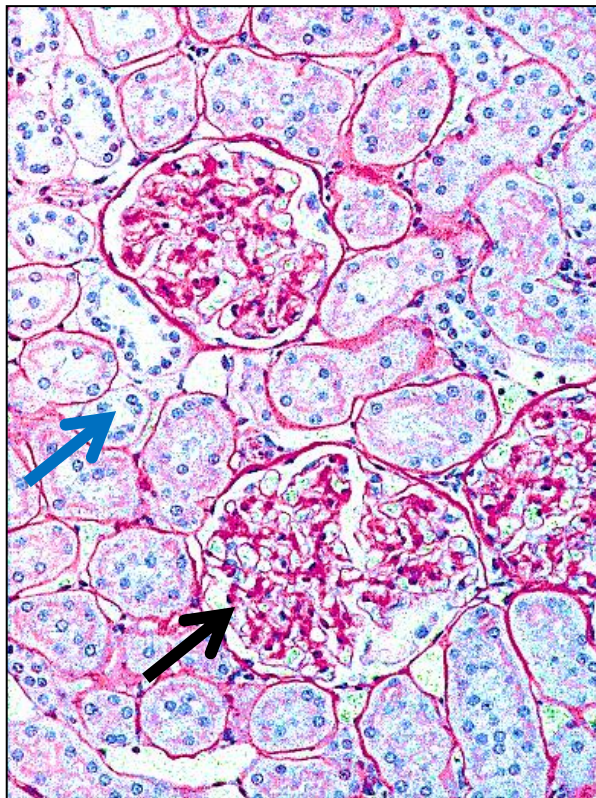


Figure 1-1 Histological structure of Kidney (magnification $\times 100$)

Black arrow : Glomerulus Blue arrow: Tubule

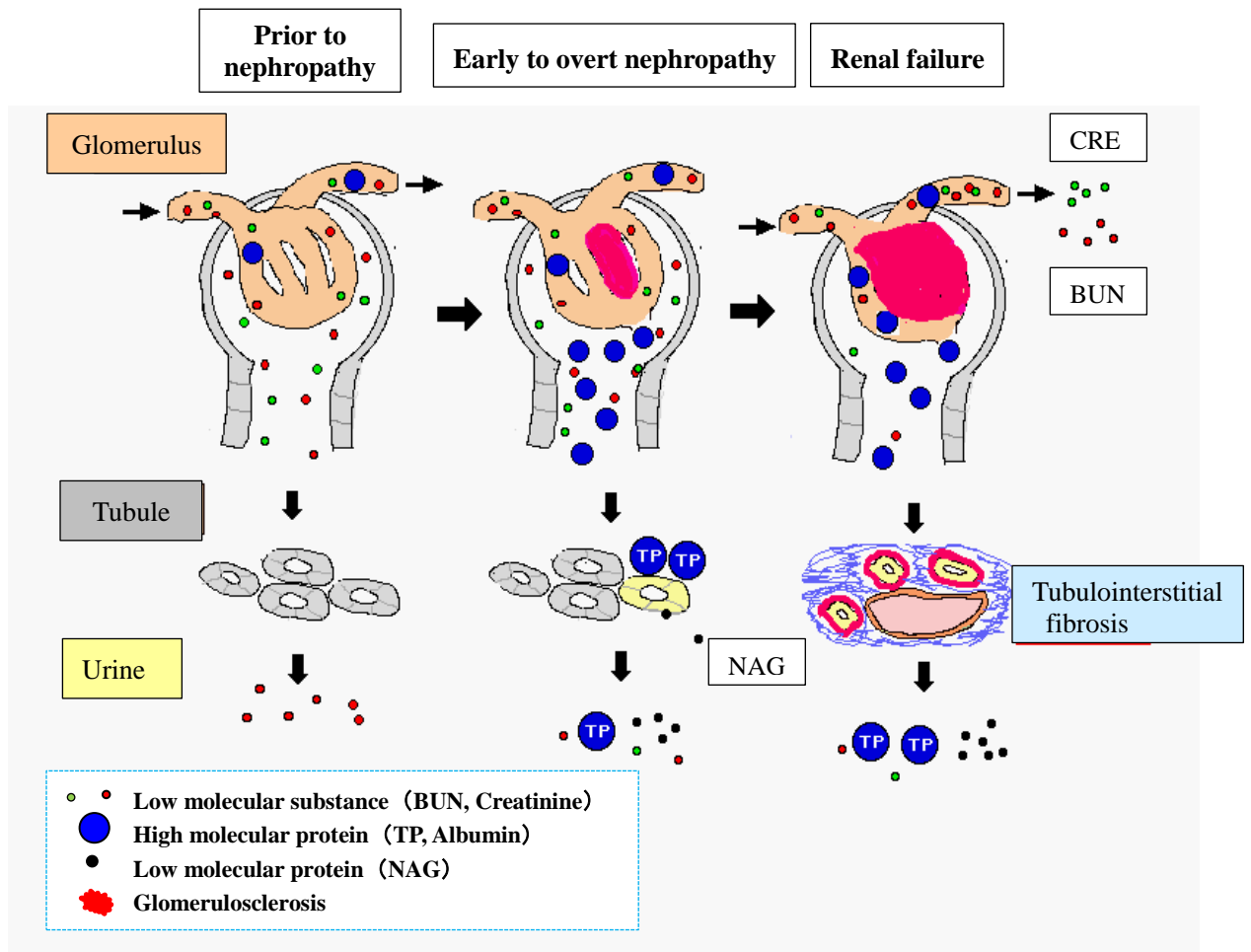


Figure 1-2 Progression of renal damage

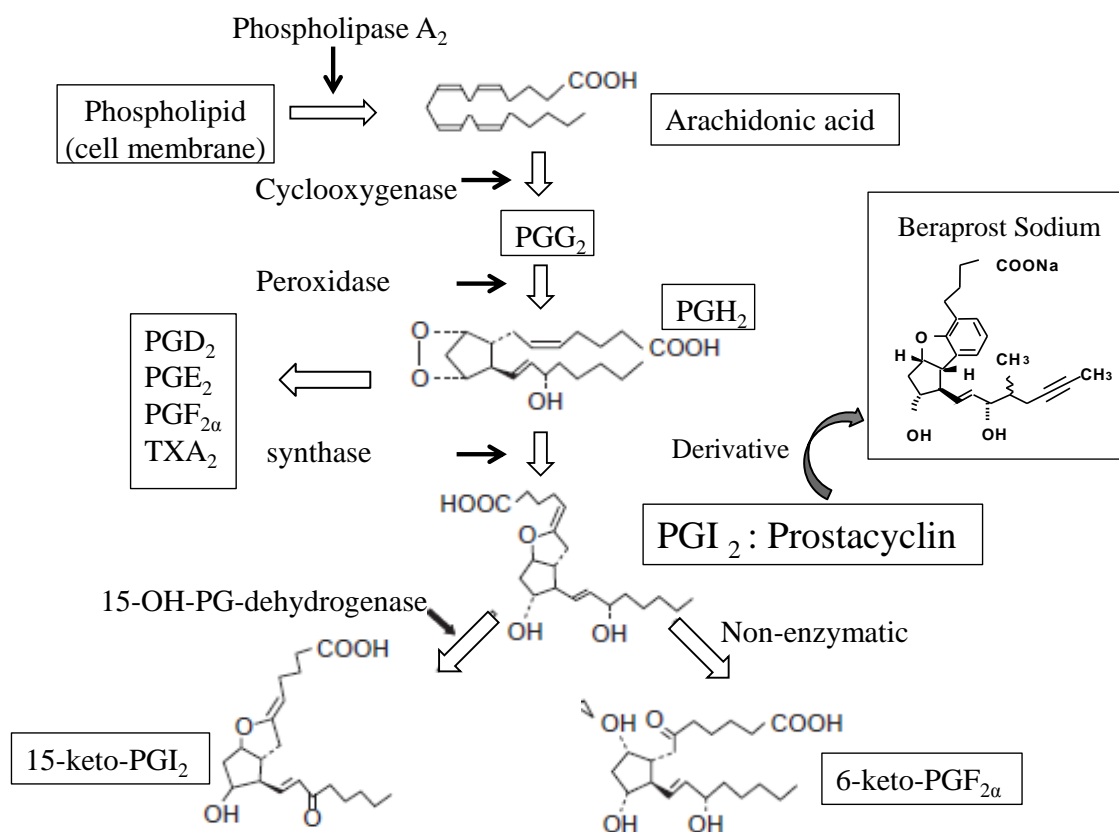


Figure 1-3 Synthesis and metabolism of Prostacyclin

第 2 章 非肥満型糖尿病モデルラットの長期飼育により発現した 病態の尿・血液パラメータならびに病理組織学的手法を用い た解析とヒト糖尿病性腎症との比較

2.1 緒言

GK ラットの特徴

高血糖に起因した腎障害の進展や、その進展抑制作用を持つ薬物を評価するためには、肥満の諸病態（高血糖、高脂血症など）の因子のない非肥満型動物モデルが有用である。GK ラットは Wistar ラットの糖負荷試験 (OGTT) で軽度耐糖能が低下している個体の交配を重ねることにより確立された系統で、軽度な血糖上昇と、糸球体肥大、糸球体基底膜肥厚といった軽度な腎組織障害がみられ、ヒト糖尿病性腎症の初期病変と類似しているといわれている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。

事前確認として低週齢の GK ラットの腎組織学的解析によりヒト糖尿病性腎症の初期病変との類似性を確認できたことから、GK ラットを非肥満型糖尿病性腎症のモデル候補として選択した。

GK ラットの課題

非肥満型の 2 型糖尿病モデル GK ラットは肥満の要因がないため腎障害が軽度であり 12 ヶ月齢程度になってもあまり進展がみられない。そのため、GK ラットに抗 Thy1.1 抗体を投与してメサングウム細胞に障害を与えたり、bFGF 投与により糸球体上皮細胞に障害を誘発させるなど、様々な障害を付加する試みがなされているが、いずれも病態進展がみられないと報告されている^{21), 22)}。そのため、ヒトの腎組織障害と類似した進展を示す評価系を自ら構築する必要があった。

そこで、ヒト糖尿病性腎症は糖尿病に罹患して長期間高血糖状態が持続した後に発症すること、また加齢によっても腎機能が低下することに着目し、ラットの寿命付近である 24 ヶ月という非常に長期間解析を継続し、ヒト糖尿病性腎症との類似性を評価した。また、ヒトとの類似性の評価においては、序論で述べたように、病理組織学的解析の手法を導入し、モデル選択のための最重点項目とした。

2.2 材料と方法

使用動物

雄性 GK ラット（日本クレア）および対照として同週齢の Wistar ラット（日本クレア）を使用した。動物は、明暗周期 7 時～19 時、温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ に維持された実験室内で自由摂水、摂餌下で飼育した。動物実験は施設内動物実験指針に基づいて設置された動物実験倫理委員会の承認を受けた後、実施した。

尿ならびに血液パラメータの測定

8、12 ならびに 24 ヶ月齢において、ラットを代謝ケージに入れ、自由摂食・摂水下で約 24 時間採尿を行い、遠心分離（3,000 rpm、室温、10 分）により上清を採取した。血液は尾静脈より採取し、遠心分離（3,000 rpm、 4°C 、15 分）により血清を得た。

腎障害関連パラメータは、尿中総タンパク（Micro TP Test Kit、和光純薬工業）、尿および血清中クレアチニン（CreatinineII-HA Test Kit、和光純薬工業）、Blood Urea Nitrogen (BUN)（Urea Nitrogen B Test Kit、和光純薬工業）測定試薬を用い、96 穴マイクロプレート内で発色反応を行い、プレートリーダーで吸光度を測定した。スタンダードを用いて作製した検量線よりで各サンプルの濃度を算出した。各サンプル当たり 2 回測定し、平均値を個体値（濃度）とした。血糖 は血糖値測定器（アントセンス II）を用いて測定した。

腎組織標本の作製

8、12 ならびに 24 ヶ月齢におい各 4-5 匹のラットより腎臓を採取して 10 % 中性緩衝ホルマリン固定後パラフィン切片を作成し、糸球体硬化ならびに尿細管間質障害評価のため PAS 染色を行った。

免疫染色

上記のパラフィン切片を用い、メサングウム細胞ならびに尿細管間質細胞の形質転換の指標として、 αSMA マウスモノクローナル抗体（DAKO 社）、糸球体ならびに尿細

管間質中のコラーゲン蓄積を検出するため、IV 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体（LSL 社）を、炎症性細胞の浸潤の指標としてラットマクロファージ特異抗原である ED-1 マウスモノクローナル抗体（Serotec 社）を用い、Avidin-Biotin Complex 法²³⁾にて免疫染色した。

病理組織学的解析

腎障害

腎障害についてはPAS染色標本を用いて糸球体ならびに尿細管障害をスコア化した。

糸球体障害は各個体 100 個の糸球体について、糸球体毎に障害部分の面積を下記のようにスコア化した。各スコアの例を Figure 2-1 に示した。

0: 正常、1+: メサングウム領域拡大のみ、2+: 硬化 ～50 %、
3+: 硬化 51～75 % 、4+: 硬化 76～100 %

尿細管間質障害は個体毎に皮質部分の各 20 視野（倍率 10×5）について、障害がみられる領域の面積をそれぞれ下記のようにスコア化した。

0: 正常、1+: ～10 %、2+: 11～25 %、3+: 26～50 %、4+: 51～75 %、
5+: 76～100 %

αSMA

αSMA の発現は PAS 染色と同様に、各個体 100 個の糸球体について糸球体毎に陽性部分の面積を、スコア化した。

0: 0 %、1+: ～10 %、2+: 11～25 %、3+: 26～75 %、4+: 76～100 %

尿細管間質は個体毎に皮質部の各 20 視野（倍率 10×5）について、発現がみられる領域の面積をそれぞれ下記のようにスコア化した。

0: 0%、1+: ～25 %、2+: 26～50 %、3+: 51～75 %、4+: 76～100 %

IV 型コラーゲン蓄積量

IV 型コラーゲン蓄積量は各個体 100 個の糸球体について、糸球体毎に陽性部分の面

積をスコア化した。

0: 0 %、1+: 正常メサングウムのみ、2+: ~25 %、3+: 26~75 %、4+: 76~100 %

尿細管は個体毎に皮質部の各 20 視野 (10×5) について、陽性部位 (間質) がみられる領域の面積を下記のようにスコア化した。

0: 0%、 1+: ~25 %、 2+: 26~50 %、 3+: 51~75 %、 4+: 76~100 %

ED-1 陽性細胞

糸球体における ED-1 陽性細胞の浸潤は、各個体 100 個の糸球体についてカウントした。尿細管間質への浸潤数は、皮質部の各 20 視野 (10×5) についてカウントした。

統計学的解析

すべてのデータは平均値±SE にて示した。計量値は ANOVA と student t test で、計数値は Wilcoxon tests にて有意差検定を行った。p< 0.05 の場合に有意差有りとした。

2.3 結果

尿ならびに血液パラメータを用いた腎機能障害進展の解析

GK ラットでは高血糖は 8 ヶ月齢よりみられ、24 ヶ月齢まで持続した。観察期間中同月齢の Wistar ラットと比較して有意に高値であった。尿中タンパク排泄量は 24 ヶ月齢のみ増加し、同月齢の Wistar ラットの約 1.5 倍であった。クレアチニークリアランスと BUN は GK ラットと Wistar ラットいずれも 24 ヶ月齢まで変化はなかった (Table 2-1)。

病理組織学ならびに免疫組織化学的手法を用いた腎組織障害進展の解析

GK ラットにおいて、8 ヶ月齢ではメサングウム細胞の軽度な増殖がいくつかの糸球体にみられ、12 ヶ月齢になるとその割合が増加した。尿細管の変化は 12 ヶ月齢まではみられなかった。24 ヶ月齢になると、糸球体のメサングウム細胞増殖、分節性硬化や、尿細管の拡張、萎縮、基底膜の肥厚、間質の線維化が顕著にみられるようになった。糸球体のサイズについては 8 ヶ月齢より Wistar ラットと比較して大きい傾向がみられ

た (Figure 2-2)。これらの変化はヒトの糖尿病性腎症の顕性腎症期^{6), 11)}にみられる障害像と類似していた。

一方、Wistar ラットでは 12 ヶ月齢において、メサンギウム細胞のわずかな増加がごく一部の糸球体にみられたのみだった。24 ヶ月齢においても尿細管の軽度な障害や一部の糸球体にメサンギウム細胞の軽度な増殖がみられたのみであった (Figure 2-2)。

さらに、糸球体の障害スコアは観察期間中同月齢の Wistar ラットと比較して有意に高値であった (Figure 2-3A)。GK ラットの尿細管障害は Wistar ラットと比較してより高度であったが、統計学的な有意差はみられなかった (Figures 2-2, 2-3B)。

GK ラットにおいて α SMA は正常でもみられる血管平滑筋とともに、障害を受けた糸球体と尿細管間質の両方に発現がみられた。24 ヶ月齢には尿細管間質の陽性領域が顕著に増加し、糸球体における発現も障害の進展に伴って増加した。更に、24 ヶ月齢における尿細管間質の α SMA の発現スコアは同月齢の Wistar ラットと比較して有意に高かった (Figures 2-4, 2-5)。

IV型コラーゲンは GK ラットの糸球体硬化部位ならびに尿細管間質障害領域に過剰発現がみられた。糸球体においては 8 ヶ月齢ではメサンギウム細胞における発現は正常であったが、24 ヶ月齢では発現領域の拡大がみられた。一方、Wistar ラットでは発現領域の拡大はみられず、24 月齢において GK ラットの糸球体での発現量は有意に高値であった。GK ラットの尿細管間質では 24 ヶ月齢において発現領域の拡大がみられた。GK ラット 24 ヶ月齢における尿細管間質での発現量は同月齢の Wistar ラットと比較して有意に高値であった (Figures 2-6, 2-7)。

ED-1 陽性細胞の浸潤は腎障害の進展に伴って増加した。GK ラットにおいては ED-1 陽性細胞の浸潤は糸球体硬化領域と尿細管間質障害領域に顕著であった。特に、ED-1 陽性細胞の浸潤は 24 ヶ月齢で顕著であり、糸球体における浸潤は、同月齢の Wistar ラットと比較して有意に多かった (Figures 2-8, 2-9)。

2.4 考察

本章では非肥満型糖尿病モデル GK ラットを用い、糖尿病により高血糖状態が長期に持続した場合の腎障害の進展とヒト糖尿病性腎症との類似性を評価した。すでに他の研究者により 8 ヶ月齢において糸球体肥大、糸球体の基底膜肥厚といったヒト糖尿病性腎症の初期病変に類似した組織学的変化がみられるが、12 ヶ月齢程度でも障害の進展はみられないことが報告されている¹⁹⁾⁻²¹⁾。

しかしながら、ヒト糖尿病性腎症は糖尿病に罹患して長期間高血糖状態が持続した後に発症すること、また加齢によっても腎機能が低下することに着目し、さらに解析期間を延長すれば病態が進展するのではないかと考え、本章の研究ではラットの寿命付近である 24 ヶ月齢まで腎臓組織パラメータならびに病理組織学的解析を試みた結果、GK ラットにおいても腎機能や腎組織障害が進展することを初めて明らかにした。

ヒト糖尿病性腎症の機能的、組織学的特徴としては、糸球体過剰濾過²⁴⁾、糸球体濾過能低下、微量アルブミン尿の増加^{9), 10), 25)}や糸球体硬化、尿細管間質線維化などの組織障害^{7), 8)}などが報告されている。これらの特徴は血中グルコースの代謝異常などにより高血糖状態に腎臓が長期に曝されたためと考えられる。*In vitro* の実験において糸球体メサンギウム細胞と近位尿細管細胞に高濃度のグルコースを曝露すると、グルコースの代謝経路であるポリオール経路が活性化され、サイトカインの産生、IV型コラーゲンなどの基質成分の遺伝子発現が亢進することが報告されている²⁶⁾⁻³⁰⁾。これらの結果として早期段階にメサンギウムにおける筋線維芽細胞の増加といった組織学的変化もみられ始める。高血糖状態で活性化した尿細管間質の線維芽細胞や活性化メサンギウム細胞である筋線維芽細胞は α SMA を発現しており、細胞外基質を異常産生し、糸球体硬化や尿細管間質における線維化の進展に重要な役割を担っている³⁰⁾⁻³⁴⁾。マクロファージも細胞外基質の産生を促進し、糸球体硬化や尿細管間質線維化を引き起こす^{35), 36)}。また、尿細管間質のマクロファージ浸潤の程度は腎臓機能の低下と相関すると

いわれている^{35), 37)}。

本章の研究において、GK ラットは試験期間中高血糖を維持していたことから、腎臓が長期間高血糖状態に曝されていたことになる。12 ヶ月齢までは腎組織障害は軽度であったが、24 ヶ月齢まで高血糖状態に曝されることにより、メサングウム細胞の増加、糸球体硬化、尿細管の間質線維化、萎縮、拡張、基底膜の肥厚、炎症性細胞の浸潤といった進行期の腎組織障害が見られることが明らかになった。また、活性化したメサングウム細胞と尿細管間質の線維芽細胞の指標である α SMA の発現や、細胞外線維の形成を示すIV型コラーゲンの異常蓄積も同様に 24 ヶ月齢の糸球体と尿細管間質にみられた。マクロファージの浸潤は腎臓組織障害の進展に伴って増加した。これらの組織学的特徴は、前述のヒト糖尿病性腎症と類似していた。一方、正常対照として設定した Wistar ラットでは、腎組織学的変化、糸球体ならびに尿細管間質における α SMA の発現、IV型コラーゲンの蓄積、マクロファージの浸潤は GK ラットと比較して全体的にみて軽度であった。

糸球体ならびに尿細管の障害パラメータである尿中タンパクは GK ラットにおいて 12 ヶ月齢以降上昇した。同月齢の Wistar ラットにおいても加齢に伴う変化として尿中タンパクの上昇がみられたが GK ラットと比較して低値であり、また糸球体や尿細管の障害も軽度であった。これらの結果より GK ラットでみられた腎の機能的、組織学的障害は加齢のみによるものではなく、高血糖などの糖尿病状態に長期曝露されていたためであることが示唆された。一方、腎不全期のパラメータである BUN やクレアチニンクリアランスは 24 ヶ月齢においても Wistar ラットと差異はなかったことから、更なる進展には何らかの付加的な加速因子が必要であると考えられる。

以上より、GK ラットは肥満に伴う因子がないため病態の進展が緩やかであるが、本章の研究のように長期的な解析を行うことにより、長期間高血糖状態に曝されるとともに加齢の要因が付加され、ヒト糖尿病性腎症の病態進展に類似した腎機能、腎組織

学的特徴を示すモデルなりうることを示すことができた。本モデル系は、その特徴を活かし、糖尿病性腎症の高血糖による腎障害に対する改善効果に特化した薬物の創出や、有効性が確認された薬物の糖尿病性腎症への直接作用の有無などのメカニズムを解明できる新たな評価系として活用できると考えられる。

Table 2-1 Renal function of GK rats and Wistar rats.

		Urinary protein (mg/day)	Creatinine Clearance (mL/min)	BUN (mg/dL)	Glucose (mg/dL)
Age (months)					
8 months	GK	25.9 ± 2.4	1.81 ± 0.09*	16.4 ± 0.9	238 ± 21*
	Wistar	19.9 ± 5.3	2.50 ± 0.14	14.4 ± 1.0	141 ± 5
12 months	GK	38.8 ± 3.6	2.06 ± 0.17	17.5 ± 0.3*	249 ± 17*
	Wistar	29.2 ± 10.0	2.50 ± 0.17	11.3 ± 0.6	128 ± 4
24 months	GK	257.0 ± 32.3	1.94 ± 0.08*	15.6 ± 0.7	233 ± 12*
	Wistar	176.1 ± 53.3	2.40 ± 0.30	14.5 ± 1.2	152 ± 12

Values are mean ± SE. * $P < 0.05$ vs. age-matched Wistar rats.

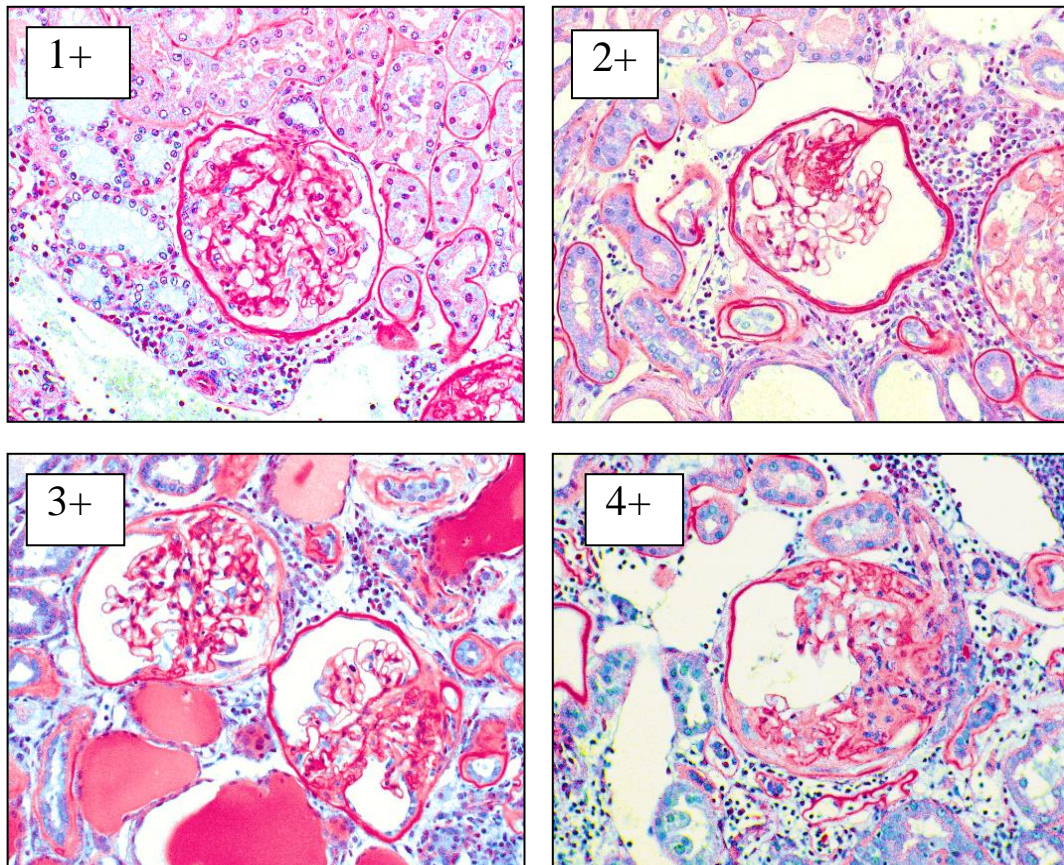


Figure 2-1 Scoring of glomerular morphological lesions.

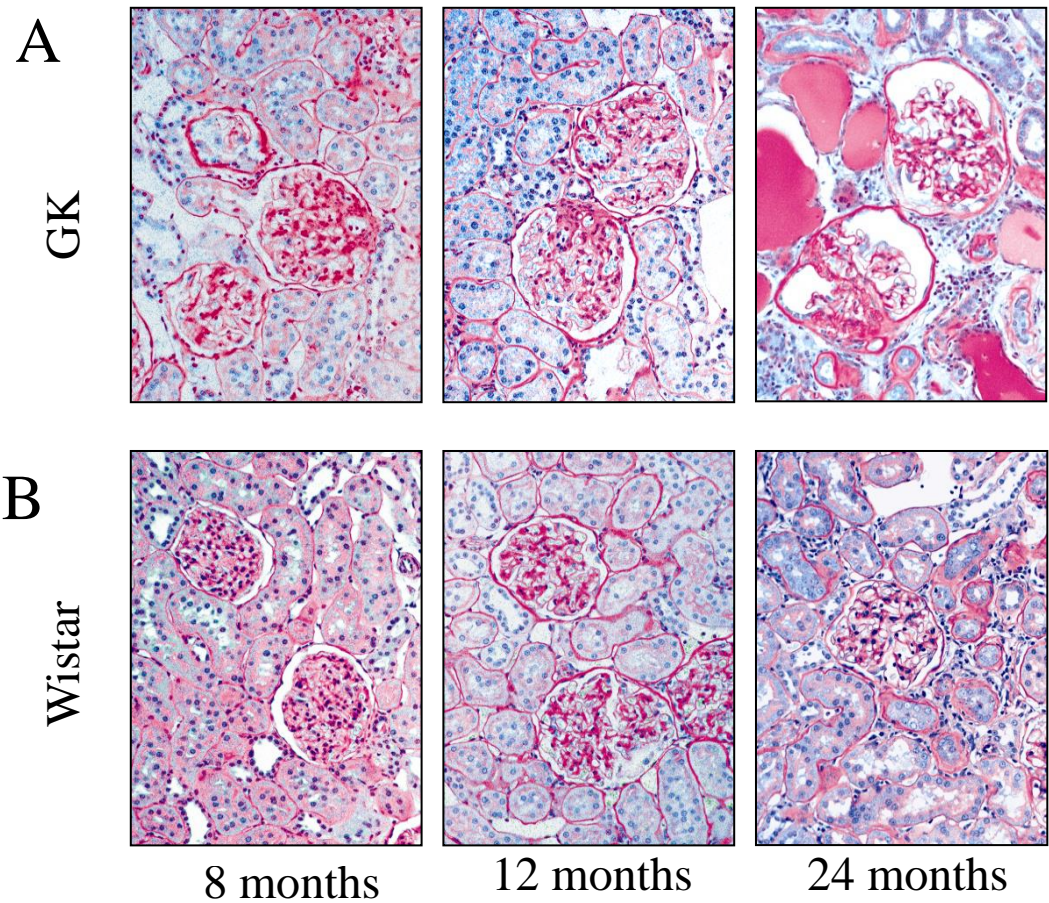


Figure 2-2 Renal morphology of GK (A) and Wistar rats (B) at eight, twelve and twenty-four months of age (magnification $\times 100$).

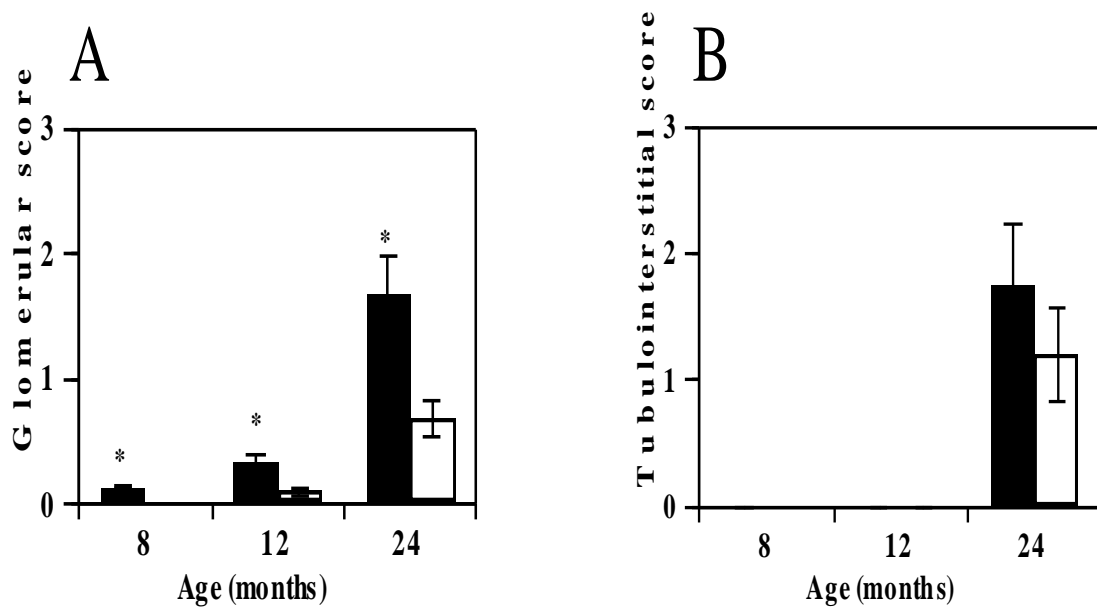


Figure 2-3 Morphological scores for glomerular lesions (A) and tubulointerstitial fibrosis (B) in the kidneys of GK and Wistar rats. Values are mean \pm SE. * $P < 0.05$ vs. age-matched Wistar rats. Symbols: GK rats = black columns; Wistar rats = open columns.

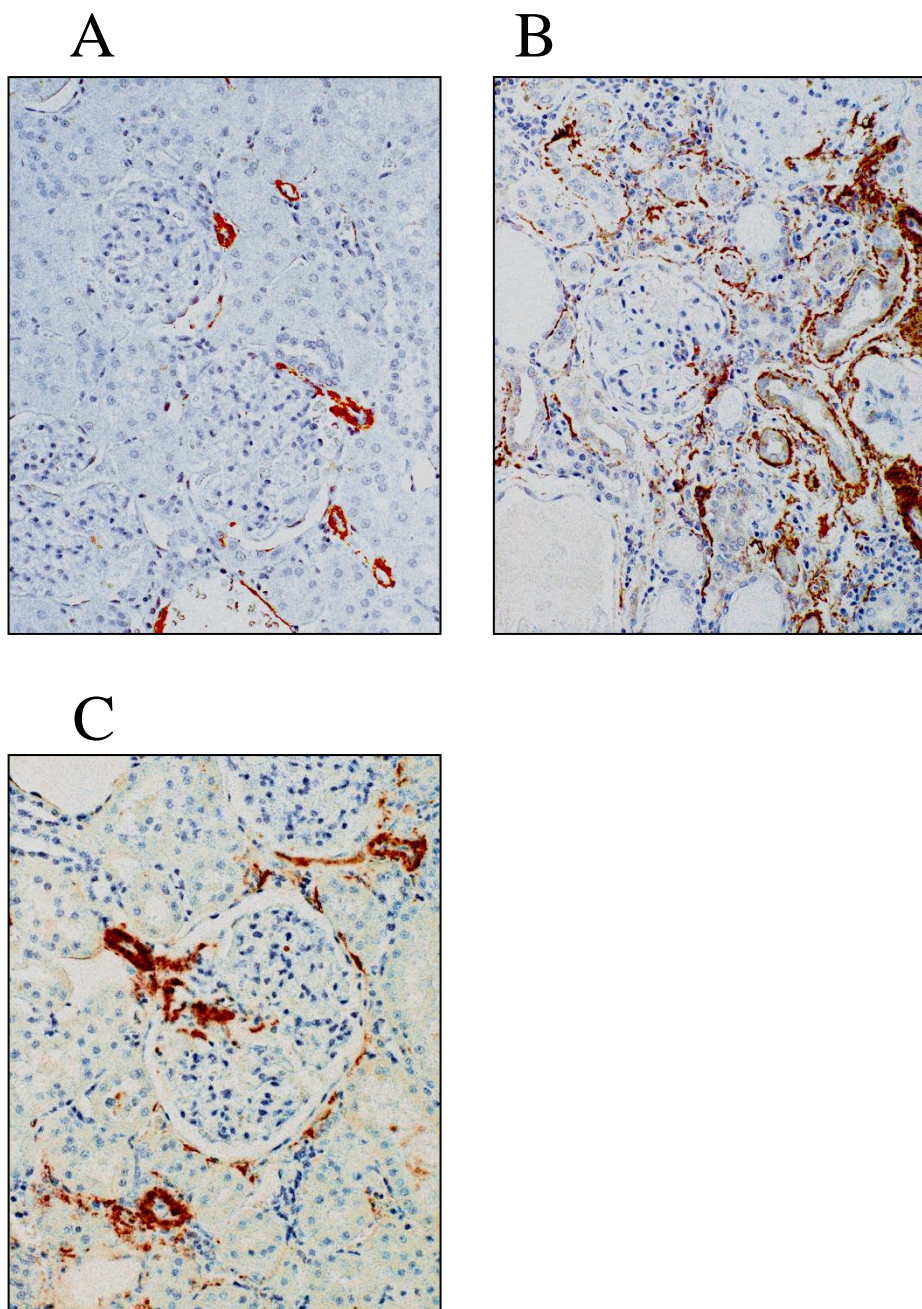


Figure 2-4 Changes in α -SMA expression in the kidneys of GK and Wistar rats (magnification $\times 100$). A: GK rat at eight months of age, B: GK rat at twenty-four months of age, and C: Wistar rat at twenty-four months of age.

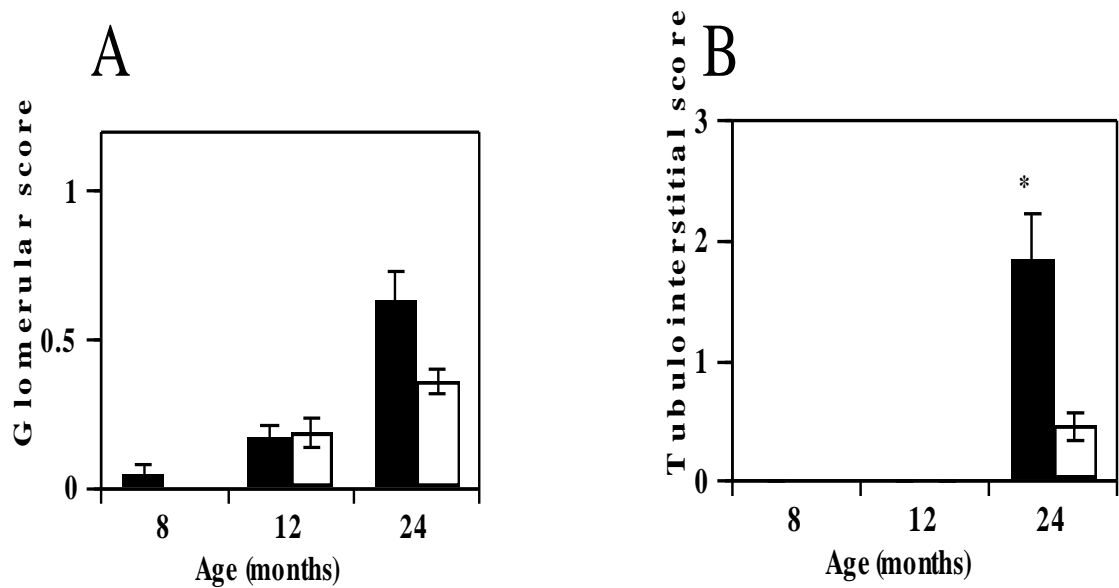


Figure 2-5 Immunostaining scores for glomerular (A) and tubulointerstitial (B) α -SMA expression in GK and Wistar rats. Values are mean \pm SE. * $P < 0.05$ vs. age-matched Wistar rats. Symbols: GK rats = black columns; Wistar rats = open columns.

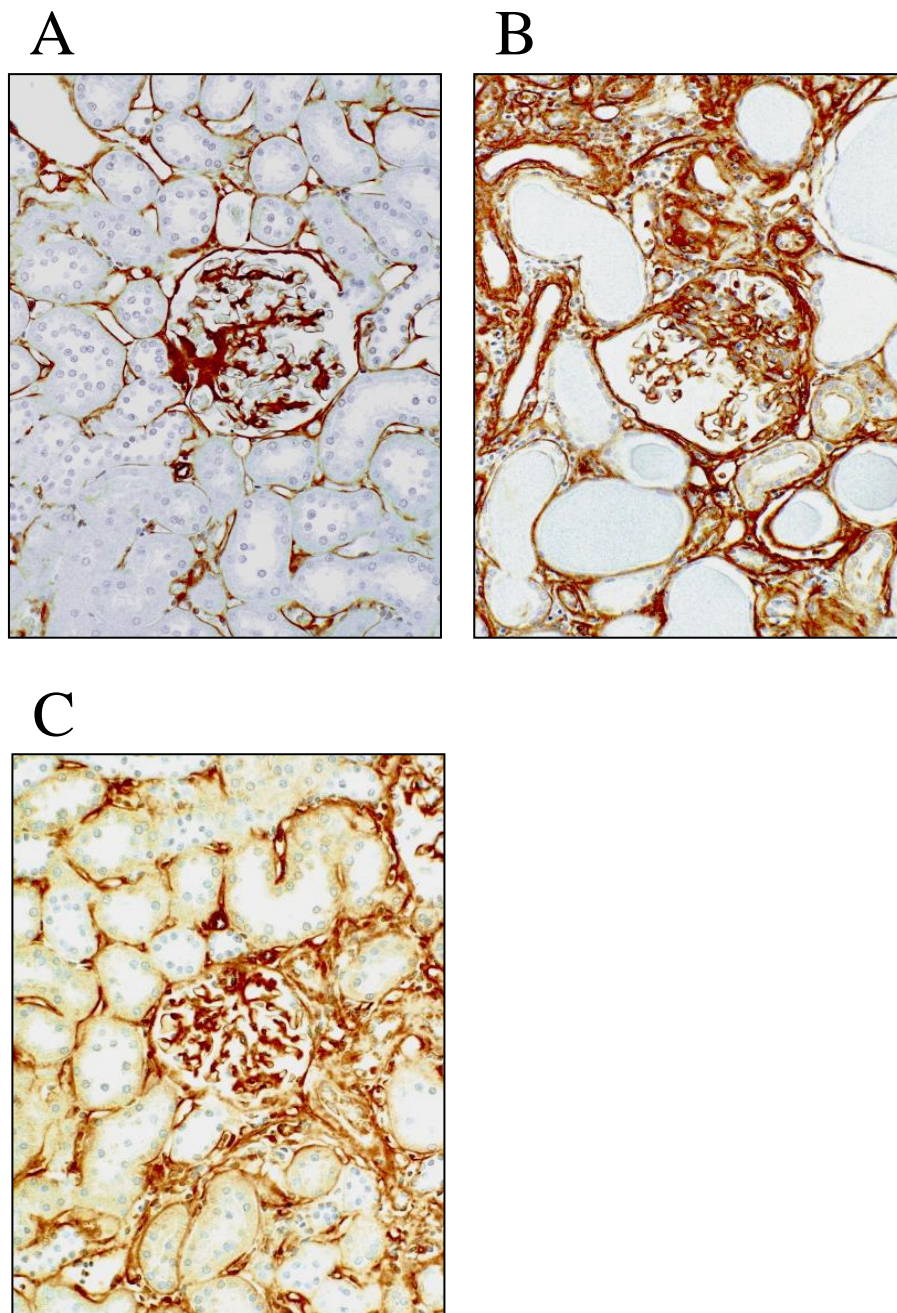


Figure 2-6 Changes in type IV collagen accumulation in the kidneys of GK and Wistar rats (magnification $\times 100$). **A:** GK rat at eight months of age, **B:** GK rat at twenty-four months of age, and **C:** Wistar rat at twenty-four months of age.

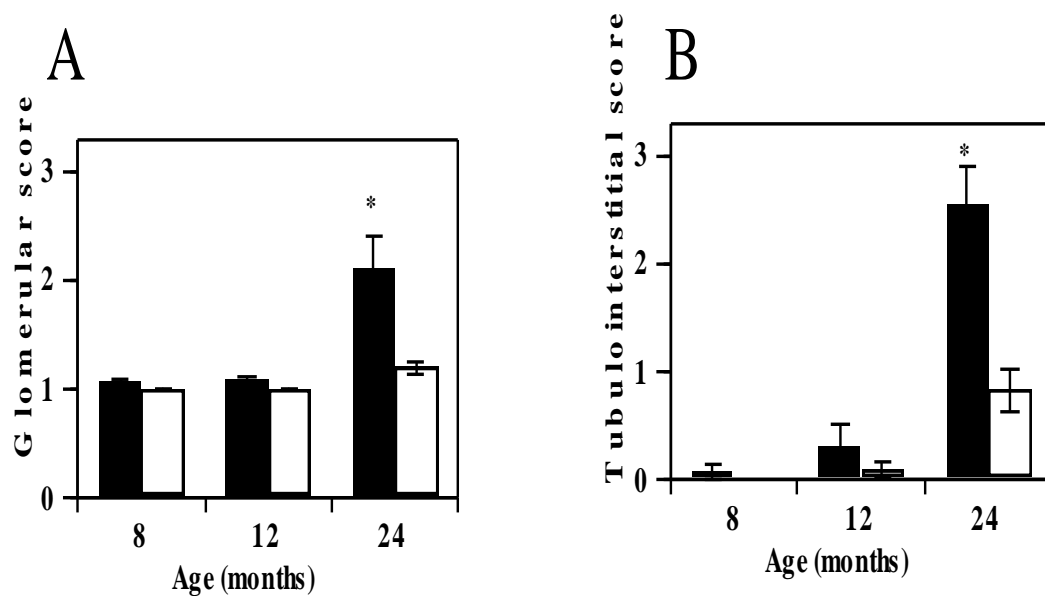


Figure 2-7 Immunostaining scores for glomerular (A) and tubulointerstitial (B) type IV collagen accumulation in GK and Wistar rats. Values are mean \pm SE. * $P < 0.05$ vs. age-matched Wistar rats. Symbols are: GK rats = black columns; Wistar rats = open columns.

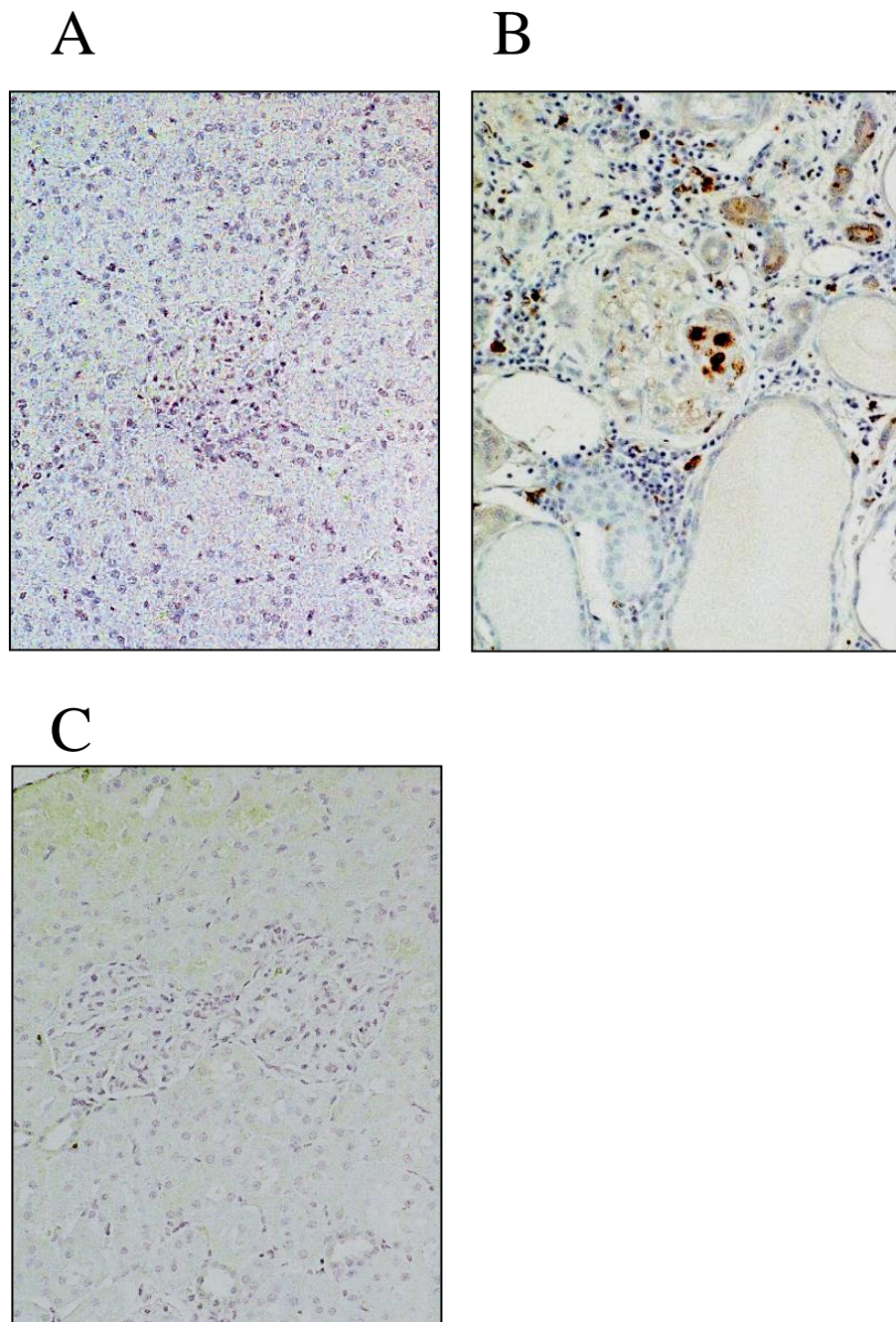


Figure 2-8 Changes in macrophage infiltration (magnification $\times 100$). **A:** GK rat at eight months of age, **B:** GK rat at twenty-four months of age, and **C:** Wistar rat at twenty-four months of age.

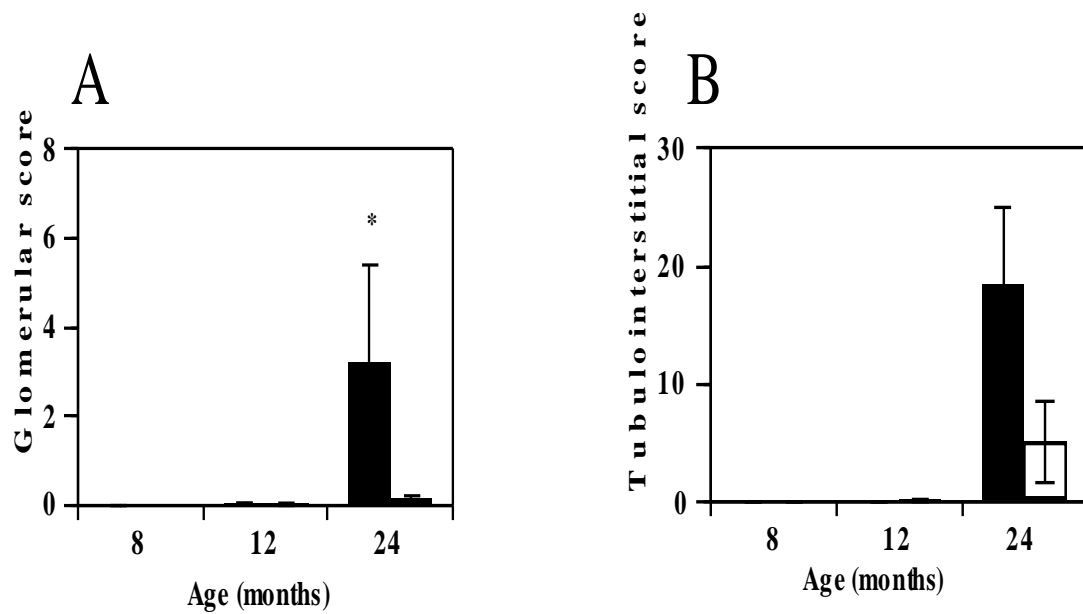


Figure 2-9 Immunostaining scores for glomerular (A) and tubulointerstitial (B) macrophage infiltration in GK and Wistar rats. Values are mean \pm SE. * $P < 0.05$ vs. age-matched Wistar rats. Symbols: GK rats = black columns; Wistar rats = open columns.

第 3 章 肥満型糖尿病モデルラットの糖尿病病態進展に伴う尿・血液パラメータならびに病理組織学的変化の解析とヒト糖尿病との比較

3.1 緒言

ヒトの2型糖尿病の多くは肥満型であることから、糖尿病性腎症治療薬を開発する上では、肥満型のモデルが必要となる。

Zucker ラットはアルビノラットの13C系統と黒色ラットM系との交雑種13M系の突然変異として発見された。Zucker ラットのうち、病因遺伝子 ($Lepr^{fa}$ 遺伝子) をホモに持つ個体 ($Lepr^{fa}/Lepr^{fa}$) のみが肥満を呈し野生型 (+ / +) は肥満を示さない (Zucker-lean ラット、以下 lean ラット)。 $Lepr^{fa}/Lepr^{fa}$ (以下 Zucker ラット) は4週齢頃より肥満がみられたのち急速に病態が進行し高血糖、高インシュリン血症、高脂血症がみられることが知られている¹⁷⁾。また、インスリン抵抗性、耐糖能異常などヒトの病態³⁸⁾と類似していることから、肥満型2型糖尿病モデルとして広く使用されている³⁹⁾⁻⁴¹⁾。しかしながら、腎組織障害の進展についてはあまり検討がなされていなかったことから、本モデルのヒトとの類似性を見極めるために、血液パラメータにより糖尿病の進展を確認するとともに、腎臓の病理組織学的解析によりヒト糖尿病性腎症における組織障害との類似性を評価した。

3.2 材料と方法

使用動物

日本チャールズリバー株式会社から購入した雄性 Zucker fatty rat (Crlj:ZUC- $Lepr^{fa}/Lepr^{fa}$) ならびに正常対照として、Zucker lean rat (Crlj:ZUC- $Lepr^{+/+}$ or $Lepr^{fa/+}$) を5週齢で購入し、約1週間の馴化後試験に使用した。動物は、明暗周期7時～19時、温度 $23\pm2^{\circ}\text{C}$ に維持された実験室内で自由摂水、摂餌下で飼育した。動物実験は施設内動物実験指針に基づいて設置された動物実験倫理委員会の承認を受けた後、実施した。健康状態の確認のため、体重は週に1回測定した。

尿ならびに血液パラメータの測定

7、11、15、19、23 ならびに 27 週齢において、ラットを代謝ケージに入れ、自由

摂食・摂水下で約 24 時間採尿を行い、遠心分離（3,000 rpm、室温、10 分）により上清を採取した。血液は 6、8、9、10、11 週齢、ならびに以降は隔週で 29 週齢時に尾静脈より採取し、遠心分離（3,000 rpm、4℃、15 分）により血清を得た。腎障害関連パラメータは、尿中総タンパク（Micro TP Test Kit）ならびに血清中の血糖（N-assay GLU-UL, Nittobo）、トリグリセライド（N-assay L TG-H, Nittobo）測定試薬を用い、生化学自動分析装置（Prestige 24i）で各サンプル当たり 2 回測定し、平均値を個体値（濃度）とした。インシュリンは市販の ELISA キット（Rat Insulin ELISA, Mercodia）にて測定した。

病理組織学的解析

29 週齢においてラットより腎臓を採取して 10 % 中性緩衝ホルマリン固定後パラフィン切片を作成し、糸球体硬化ならびに尿細管間質障害評価のため PAS 染色を行った。PAS 染色標本について糸球体ならびに尿細管間質障害など、腎組織障害の様相を観察した。

3.3 結果

血液パラメータを用いた糖尿病の病態進展の解析

随時血糖は正常比較対照の lean ラットでは一定であったが、Zucker ラットでは 11 週齢以降顕著に上昇して開始時の約 2 倍となりその後高血糖状態を維持していた (Figure 3-1A)。血中インシュリンは lean ラットでは一定であったが、Zucker ラットでは血糖値の上昇に伴って増加して、13 週齢以降には開始時の約 20 倍に至りその後低下した (Figure 3-1B)。高脂血症の指標であるトリグリセライドは lean ラットでは一定であったが、Zucker ラットでは 8 週齢以降顕著に上昇し 29 週齢には 6 週齢の 10 倍以上となった (Figure 3-1C)。体重は徐々に増加して lean ラットの 1.5 倍程度になった (Figure 3-1D)

尿パラメータならびに病理組織学的手法を用いた腎臓組織障害進展の解析

腎の糸球体ならびに尿細管障害の指標である尿中タンパク 1 日排泄量は lean ラットでは微増したのみであった。Zucker ラットでは 11 週齢以降顕著に上昇し、27 週齢には 7 週齢の約 70 倍になった(Figure 3-2)。

腎臓組織像をみると、lean ラットでは糸球体ならびに尿細管間質の変化はわずかであった、一方、Zucker ラットでは糸球体硬化、尿細管の萎縮、基底膜肥厚、間質の線維化と炎症性細胞がみられた。これはヒトの顕性腎症期に類似した組織像であった (Figure 3-3)^{6), 11)}。

3.4 考察

本章では肥満型糖尿病モデル Zucker ラットについて、尿、血液パラメータとともに、病理組織学的解析を加え、糖尿病の進展と糖尿病性腎障害の組織学的変化について、ヒト糖尿病性腎症との類似性を評価した。

序論で述べたように、糖尿病の発症とそれに引き続く糖尿病性腎症の根本的なメカニズムは非常に複雑であり完全には解明されていないが、肥満型 2 型糖尿病患者では多くの場合、高血糖、高脂血症とともに耐糖能異常、インスリン抵抗性がみられることが知られている。これらの異常は大小血管障害引き起こし、血管障害とかかわりの深い心筋梗塞、腎症、神経障害といった合併症のリスクファクターとなっている⁴²⁾。

Zucker ラットは食欲をコントロールするレプチンの受容体変異により過食から肥満となり、高血糖、高インスリン血症、高脂血症など、ヒトと類似した病態を示すことが知られている¹⁷⁾。また、予備的に低週齢の腎臓を用いて病理組織学的解析を実施したところ、ヒトの糖尿病性腎症の初期病変に類似していたことから、モデル候補として選択し、病態の詳細をより長期間（約 7 ヶ月齢）にわたり評価した。

本研究において検討開始より体重が顕著に上昇し、観察期間中肥満状態が徐々に進行した。糖尿病関連血液パラメータの推移をみると、血糖は 11 週齢より顕著に上昇したのち一定となり、観察期間中高血糖状態が維持されており、肥満から糖尿病が発症していることが確認された。インスリンは、血糖の上昇と連動して 11 週齢以降一過性に上昇したのち徐々に低下した。インスリンの増加は、血糖の上昇に伴い血糖を正常に低下させるために産生量が増加したためと考えられるが、さらに、インスリンの血糖低下能力が減弱する、インスリン抵抗性になり、血糖を低下させるために、より多くのインスリン量が必要となった可能性がある。また、インスリン濃度が一過性の上昇の後徐々に低下した。これは高血糖状態を改善させるためにインスリンを産生する膵臓のランゲルハンス氏島の β 細胞がインスリンを過剰産生し続けた結果、疲弊して産生能力が徐々に低下したのではないかと推察される。その他、脂質代謝異常を表すトリグリセライドは試験期間中上昇し続けたが。これは過食による摂取量増加だけでなく、ヒトでみられている脂質代謝異常に起因している可能性がある。これらの結果は、ヒト肥満型 2 型糖尿病の特徴と極めて類似していた¹⁾。

Zucker ラットにおける腎障害の解析結果より、腎障害の指標である尿中タンパクも血液パラメータと同じ 11 週齢程度より徐々に上昇するとともに、腎組織像をみると、糸球体硬化、尿細管の萎縮、基底膜肥厚、間質の線維化と炎症性細胞などがみられた。これらは、ヒト糖尿病性腎症進行期の組学的特徴と極めて類似していた⁶⁾。

以上のように、本章の研究において肥満型 2 型糖尿病モデル Zucker ラットは肥満に起因した高血糖、高インスリン血症、高脂血症など、ヒトの糖尿病と類似した複雑な病態を示すことが確認された。また、腎臓に対して、尿中タンパクの上昇のみならず、ヒト糖尿病性腎症進行期と類似した腎臓組織障害像を示すことが明らかになった。すなわち、糖尿病の発症から進展ならびに腎症の発症、進展までの複雑な過程がヒトと類似しており、糖尿病性腎症の評価系として有用であることが明らか

になった。

Zucker ラットを用いた薬物の評価系としては、尿、血液パラメータの顕著な上昇がみられ、かつ、腎組織学的変化もみられる 4~5 ヶ月齢を目安に病態の進行を見ながら解析期間を判断するのが適切であると考えられた。

第 2 章、第 3 章の研究結果より、目標としていたヒト糖尿病性腎症の腎組織障害の特徴と類似した 2 種のモデル、すなわち、腎臓に対する薬物の直接効果を明らかにするため肥満の要因のない非肥満型モデル GK ラットの評価系を新規に見出すことができた。また、原疾患である糖尿病に対する作用も合わせて解析できる肥満型モデル Zucker ラットの評価系を構築することができた。そこで、これらの評価系を用いて BPS の腎組織障害に対する有用性評価を実施した（第 4 章）。

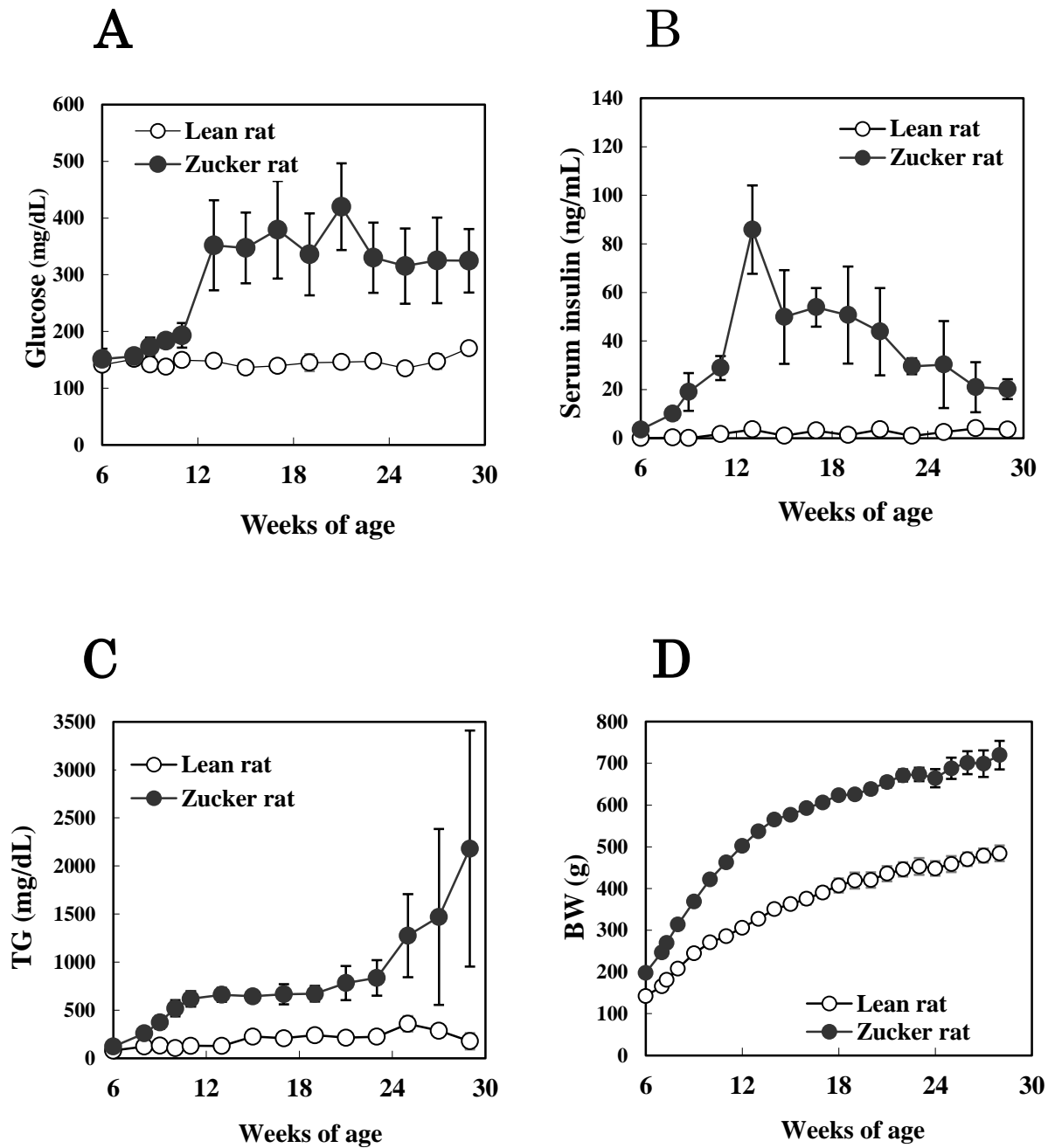


Figure 3-1 Serum glucose (A), insulin (B), triglyceride (C), and body weight (D) in obese Zucker rats (●) and Zucker lean rats (○). Values are mean \pm SE of 3-5 obese rats and 2 lean rats

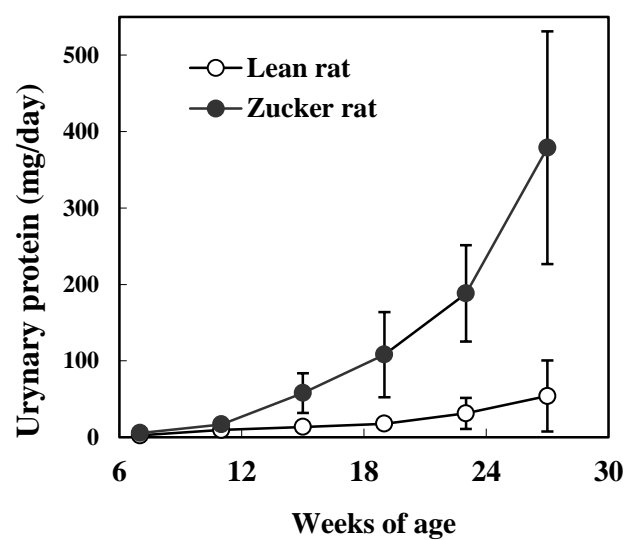


Figure 3-2 Urinary protein in obese Zucker rats (●) and Zucker lean rats (○). Values are mean \pm SE of 3-5 obese rats and 2 lean rats. Values are mean \pm SE of 3-5 obese rats and 2 lean rats.

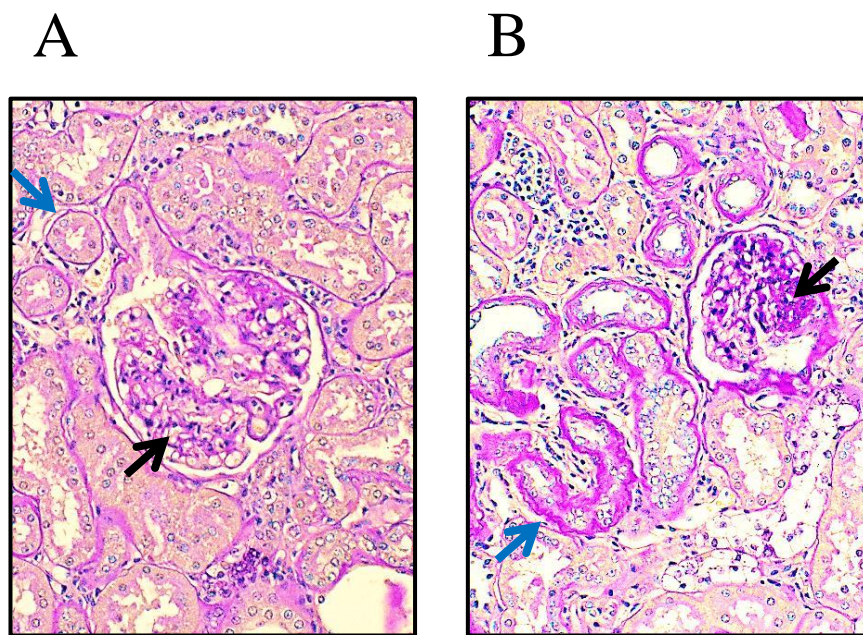


Figure 3-3 Photomicrographs of PAS staining of the kidney in lean rat (A) and obese Zucker rat (B) at seven months of age (magnification $\times 100$). Black arrow : Glomerulus Blue arrow: Tubule

第 4 章 糖尿病性腎症モデルラットを用いた BPS の糖尿病 ならびに糖尿病性腎症に対する病態進展抑制作用の 解析

4.1 緒言

第 2 章ならびに第 3 章において述べたように、ヒト糖尿病性腎症の病理組織像に類似した 2 種のモデルの構築をすることができた。

このうち、非肥満型 2 型糖尿病モデル GK ラットを用いた評価系において、BPS の薬効を 24 ヶ月齢まで解析したところ、糸球体硬化、尿細管間質線維化を顕著に抑制し、BPS が糖尿病性腎症の腎組織障害に対して進展抑制作用を有することを初めて明らかにした⁴³⁾。一方、本モデルでは BPS 投与による明確な血糖改善作用はみられなかったことから、BPS は血糖を低下させずに、直接的に糖尿病性腎症における腎組織障害の進展を抑制できる可能性が示唆された。

GK ラットを用いて腎障害に対する直接作用が明らかになったことから、次に、肥満型 2 型糖尿病モデルとして選定した Zucker ラットを用いて、腎症を含む糖尿病の複雑な病態に対する BPS の作用を多角的に解析した。

前述のように、肥満型 2 型糖尿病の発症と進展メカニズムは非常に複雑であるが、糖尿病患者では多くの場合、高血糖、高脂血症とともに耐糖能異常、インスリン抵抗性がみられることが特徴である。これらの異常は大血管や微小血管に障害を与え、心筋梗塞、腎症ならびに神経障害など、血管障害に起因した合併症発症のリスクファクターとなる⁴²⁾。骨格筋、肝臓ならびに脂肪組織はインスリン反応性器官であり、耐糖能異常やインスリン抵抗性に密接に関わっていると考えられている。中でも骨格筋でのグルコース利用能の異常は耐糖能異常や 2 型糖尿病への進展を引き起こす初期異常であるといわれている^{44), 45)}。また、糖尿病患者のグルコースの不均衡は、筋肉を走行する血管に障害を与えることにより血管内皮細胞から分泌される内因性血管拡張物質 NO の減少と、それに伴う血流量の低下と密接に関係していると推察されている⁴⁶⁾。この血流量減少は、おそらく骨格筋における更なるグルコース処理異常の引き金になっていると考えられる。NO の合成酵素(NOS)はサブタイプによってその作用と局在が

様々であることが広く知られている⁴⁷⁾⁻⁵⁰⁾。Zucker ラットにおいては、糖尿病に対する誘導型 NOS (iNOS) の関与などは相反する報告があり、NOS のサブタイプによる役割の違いは明確にはなっていない^{51), 52)}。しかしながら、血管内皮型 NOS (eNOS) に関しては、その活性の減少は糖尿病の状態悪化に密接に関係していることが示唆されている⁴⁸⁾。

BPS は強力な血管拡張作用と、血管内皮細胞における eNOS の発現の活性化作用を有する^{53), 54)}。さらに、血管拡張作用、eNOS 産生増加作用とともに、血管内皮保護作用、抗炎症作用、抗血小板作用も併せ持つことにより、BPS は末梢の血流改善作用を示すことが知られている^{55), 56)}。上記のように、糖尿病進展の重要な因子であるインスリン抵抗性には血管障害が深く関わっていることから、BPS が血管に対する種々の作用により、筋肉における血流低下や糖尿病に関わる器官・組織の血管障害を改善し、糖尿病そのものに対して何らかの改善作用を示すのではないかと考えた。また、糖尿病の進展に深く関わるインスリン抵抗性の進展にも血管障害が関わっていることから、BPS が何らかの改善作用を示す可能性がある。

Zucker ラットは遺伝的な肥満要因から 2 型糖尿病を発症し、ヒトの病態と類似したモデルとして広く利用されており³⁹⁾⁻⁴¹⁾、第 3 章の検討において、肥満に起因した高血糖、インスリン抵抗性、高脂血症ならびに糖尿病性腎症など、ヒトと肥満型 2 型糖尿病と類似した病態を示し、モデルとして適切であると判断した評価系である。また、前述のように、非肥満型 2 型糖尿病モデル GK ラットを用いた評価により、BPS が糖尿病性腎症に対して直接的な障害進展抑制作用を有することが示唆された。

そこで、本章では Zucker ラットモデル系により、肥満型 2 型糖尿病に起因した腎症に対する BPS の作用を明らかにするとともに、BPS が原疾患である糖尿病の進展から腎障害に至る複雑な病態に対して、インスリン抵抗性の改善などにより糖尿病の諸病態を改善できるかどうかを明らかにすることを目的とした。評価系としては、第 2 章、第 3

章より糖尿病ならびに糖尿病性腎症に関連した血液・尿パラメータを増やし、また、インスリンに関連した膵臓、肝臓、脂肪組織ならびに腎臓の組織障害や、血圧ならびに血流量の解析も加え、糖尿病の病態を多角的に評価できる系を構築した。

4.2 材料と方法

使用動物

日本チャールズリバー株式会社から購入した雄性Zucler fatty rat (Crlj: ZUC-Lepr^{fa}/Lepr^{fa})ならびに正常対照として、Zucker lean rat (Crlj: ZUC-Lepr^{+/+} or Lepr^{fa}/+)を5週齢で購入し、約1週間の馴化後試験に使用した。動物は、明暗周期7時～19時、温度23±2°Cに維持された実験室内で自由摂水、摂餌下で飼育した。動物実験は施設内動物実験指針に基づいて設置された動物実験倫理委員会の承認を受けた後、実施した。

馴化期間中に異常のないことを確認した後、随時血糖を指標として層別連続無作為化法によりZucler fatty ratを3群（対照群8匹、BPS 0.2 mg/kg/day群8匹、BPS 0.6 mg/kg/day群8匹）に群分けを行った。群分け後、体重、血清トリグリセライド (TG)、血清総コレステロール (Tcho)、尿中総タンパク (TP) ならびに尿中N-アセチルβ-D-グルコサミニダーゼ (NAG) についても1元配置分散分析により群間に差がないことを確認した。正常としてleanラット (lean群) は2匹設定した。

薬物の投与

BPSは蒸留水に溶解して0.3 mg/mLになるように調製した。これを原液として蒸留水を溶媒として0.1 mg/mLの溶液を調製した。これらの溶液は使用時まで冷蔵庫に保存した。溶解後の保存期間は最長1ヶ月とした。

BPS 0.2 mg/kg/day群、BPS 0.6 mg/kg/day群はBPS 0.1、0.3 mg/mL溶液をラット経口用ゾンデにて1日2回経口投与した。投与容量は1 mL/kgとし、最新体重に基づいて更新し

た。対照群には溶媒である蒸留水を同様に投与した。投与期間は7週齢より19週齢までとした。体重は健康状態の確認ならびに投与容量算出のため、投薬開始2日前(Day -2)、投薬開始1、6日後、以降は週に1回測定した。

尿の採取とパラメータの測定

7、13ならびに17週齢において、ラットを午前中（投薬期間中は投与直後）に代謝ケージに入れ、自由摂食・摂水下で約24時間採尿し、遠心分離（3,000 rpm、室温、10分）により上清を採取した。同時に摂餌量を測定した。採取した尿は生化学自動分析装置（Prestige 24i）にて尿中総タンパク（Micro TP Test Kit）ならびにNAG（N-assay L NAG Test Kit）を各サンプル当たり2回測定し、平均値を個体値（濃度）とした。

耐糖能の解析

投薬開始11週後（18週齢）に尾静脈より採血後、2 g/kg (0.4 g/mL, 5 mL/kg·BW)のグルコースを経口投与し、0.5、1、2、4時間後にエーテル麻酔下で尾静脈採血した。遠心分離（3,000 rpm、4℃、15分）して得た血清について、血糖（N-assay GLU-UL Test kit）は生化学自動分析装置を用いて、インスリンは市販のELISAキット（Rat Insulin ELISA）を用いて測定した。なお、評価前日の2回目の投与後より約16時間絶食した状態で実施した。

血液パラメータの測定

投薬期間中は尾静脈より採血して遠心分離（3,000 rpm、4℃、15分）、解剖日には腹大動脈より採血して遠心分離（3,000 rpm、4℃、20分）したものを血清サンプルとした。採血は投与前、投与開始後は1週間に1回実施した。これらについて、生化学自動分析装置（Prestige 24i）を用い、血糖（N-assay GLU-UL Test kit）、トリグリセライド（N-assay L TG-H Test kit）ならびに総コレステロール（N-assay L T-CHO-H Test kit）を各サンプル当たり2回測定し、平均値を個体値（濃度）とした。またインスリンは市販のELISAキット（Rat Insulin ELISA）を用いて測定した。

投薬開始 12 週後 (19 週齢) に尾静脈より採血した血液中のヘモグロビン A1c (HbA1c) について、HbA1c 測定試薬 (ニコカード HbA1c、エム・シーメディカル) で発色させ、ニコカード・リーダーで測定した。測定値が 3 % 以下の場合には 0 % とした。

血圧および心拍数測定

投与開始 5 週後 (12 週齢) に Tail-cuff 法 (BP-98A, Softron) を用いて収縮期血圧 (SBP) ならびに心拍数を測定した。

皮膚温度の測定

投薬開始 12 週後 (19 週齢) に投与前ならびに投与開始 2 時間後の左足裏の皮膚温をサーモグラフ (Neo Thermo TVS-700、NIPPON AVIONICS) にて測定した。各個体について約 4000 箇所の温度を測定しその平均値を個体の皮膚温とした。

病理組織標本の作製

投薬終了時に肝臓、膵臓、内臓脂肪ならびに左腎を採取して 10 % リン酸緩衝ホルマリン液で固定後パラフィン切片を作製し、HE 染色を実施した。左腎については PAS 染色も実施した。

病理組織学的解析

肝臓の空胞部分の面積の定量についてはマッキントッシュ (Apple 社製) に取り込んだ HE 染色画像 (倍率 4×2) を用いた。すなわち、個体ごとにランダムに選んだ 5 視野について画像解析システム (MacSCOPE、MITANI corporation 製) を用いて空胞部位を抽出して空胞化面積率を求め、平均値を算出した。その平均値から Lean 群の平均値を差し引いた値を各個体の値とした。

腎障害については PAS 染色標本を用いて糸球体ならびに尿細管障害をスコア化した。

糸球体は 1 個中の障害部分の面積を以下のようにスコア化した。これを各個体あたり 100 個の糸球体について実施した。

0: 正常、1+: メサングウムの変化のみ、2+: 硬化 ～50 %、3+: 硬化 51～75 %、
4+: 硬化 76～100 %

尿細管間質障害は、顕微鏡の 1 視野（倍率 10×4）における障害部分がみられる領域の面積を下記のようにスコア化した。これを 1 個体あたり 20 視野について実施しその平均値を個体の値とした。

0: 0%、1+: ～10 %、2+: 11～25 %、3+: 26～50 %、4+: 51～75 %、5+: 76～100 %

統計学的解析

体重、摂餌量、血糖、インシュリン、トリグリセライド、総コレステロール、総タンパク、NAG、心拍数、収縮期血圧、皮膚温、肝空胞化面積ならびに腎障害スコアについて、群毎平均値ならびに標準偏差を算出した。

分散分析の結果に基づき、体重、摂餌量、心拍数、収縮期血圧、皮膚温、肝空胞化面積については対照群と lean 群との間は t 検定を、対照群と BPS 群との間は二元配置分散分析後、パラメトリック Williams 検定を実施した。血糖、インスリン、トリグリセライド、総コレステロール、総タンパク、NAG、腎障害スコアについては、対照群と lean 群との間は Welch 検定を、対照群と BPS 群との間は二元配置分散分析後、ノンパラメトリック Williams 検定を実施した。P < 0.05 の場合に有意差ありとした。

4.3 結果

糖尿病の進展に伴う血液パラメータの変化を指標とした BPS の病態進展

抑制作用の解析

糖関連パラメータとして、血糖は対照群で徐々に上昇し、11週齢から試験期間中lean群と比較して有意に高値だった。BPS 0.6 mg/kg/day群は対照群でみられた血糖の上昇をlean群と同程度に抑制しており、投与期間中対照群と比較して有意に低値だった (Figure 4-1A)。

インスリンは対照群において8週齢より顕著に上昇して高インスリン血症を呈し、lean群と比較して有意に高値だった。BPS 0.6 mg/kg/day群では投与期間中のインスリンの上昇は軽度であり、対照群と比較して有意に低値であった (Figure 4-1B)。すなわち、BPS 0.6 mg/kg/day群は軽度にインスリンを上昇させて血糖をlean群とほぼ同程度に維持していた。一方、BPS 0.2 mg/kg/day群は血糖、インスリンともに対照群と差異はなかった。投与終了時 (19週齢) にHbA1cを測定したところ、対照群はlean群と比較して高値であり、BPS投与により対照群と比較して用量依存的に上昇抑制傾向がみられた (Figure 4-1C)。

脂質代謝異常の指標として、血中トリグリセライドは対照群では徐々に増加して12週齢以降やや低下したが、試験期間中lean群と比較して有意に高値であった。BPS 0.6 mg/kg/day群は対照群と比較して投与期間中概ね有意に低値だった (Figure 4-1D)。同様に、血中コレステロールは対照群で徐々に増加し、lean群と比較して有意に高値だった、BPS 0.6 mg/kg/day群は投薬後3から8週後 (10から15週齢) のみ有意に低値だった (Figure 4-1E)。

糖負荷試験において、lean群は糖負荷しても血糖は軽度に緩やかに変動したのみであった。対照群は糖負荷0.5時間後までに顕著に上昇してlean群の約2.5倍になった。両群とも0.5から1時間でプラトーに達し、負荷4時間後まで低下しなかった。その結果、対照群の血糖はlean群と比較して有意に高値であった。一方、BPS 0.6 mg/kg/day群は対照群と比較して血糖の上昇は緩やかで、かつ速やかに血糖を低下させた結果、血糖値は対照群と比較して有意に低値だった (Figure 4-2A)。糖負荷後のインスリン上昇はlean群と比較して顕著で、かつ負荷後4時間まで有意に高値であった。BPS 0.6 mg/kg/day群のインスリンの上昇は軽度であり、糖負荷後、0、0.5、4時間後には対照群と比較して有意に低値であった (Figure 4-2B)。

尿パラメータを指標とした BPS の腎障害進展抑制作用の解析

腎障害パラメータとして、尿中総タンパクは観察期間中（投薬開始から投薬10週後）lean群ではわずかな上昇しか見られなかったのに対し、対照群では顕著な上昇がみられ、7週齢から観察期間中lean群と比較して有意に高値だった（Figure 4-3A）。BPS 0.2ならびに0.6 mg/kg/day群は投与期間中、対照群と比較して尿中総タンパクの上昇を抑制する傾向を示したが、有意ではなかった。

尿中NAGは対照群において徐々に増加しlean群と比較して有意に高値であった（Figure 4-3B）。BPS 0.2ならびに0.6 mg/kg/day群は対照群でみられた尿中NAGの上昇を用量依存的に抑制し、BPS 0.6 mg/kg/day群では17週齢において有意に上昇を抑制した。

BPS の全身状態に対する作用の解析（体重、摂餌量、収縮期血圧、心拍数ならびに皮膚温度）

体重

対照群の体重は観察開始から高値であり徐々に増加し、試験期間中lean群と比較して有意に高値であった。一方、BPS 0.6 mg/kg/day群は対照群と比較して投薬7週後から投薬終了時（14から19週齢）まで有意に高値だった。BPS 0.2 mg/kg/day群は16および17週齢のみ対照群と比較して有意に高値であった（Figure 4-4A）。

摂餌量

摂餌量は、試験期間中対照群はlean群と比較して有意に高値であったが、BPS 0.2ならびに0.6 mg/kg/day群と対照群には差異はなかった（Figure 4-4B）。

収縮期血圧 (SBP)ならびに心拍数(HR)

12週齢の収縮期血圧は対照群でlean群より高い傾向がみられた($P=0.054$)、BPS 0.6 mg/kg/day群は血圧の上昇をlean群と同程度に抑制し、対照群と比較して有意に低値であった（Figure 4-4C）。

心拍数は対照群とlean群で差異はなく、BPS 0.2ならびに0.6 mg/kg/day群も同程度であ

った (Figure 4-4D)。

皮膚温度

12週齢において、投薬開始前の左足裏皮膚温は各群で明らかな差異はみられなかった (データは示さず)。投薬2時間後の皮膚温はBPS 0.6 mg/kg/day群において有意に高かった (Figures 4-5A, 4-5B)。

病理組織学的解析手法を用いた、糖尿病の進展に伴う肝臓、膵臓ならびに脂肪組織障害進行ならびに腎障害進展に対する BPS の病態進展抑制作用の解析

インスリン抵抗性などインスリンに関わる器官・組織である膵臓、肝臓、脂肪組織、ならびに腎臓について病理組織学的解析を実施した。

対照群の膵臓はlean群と比較してランゲルハンス氏島の重度な肥大、分葉化、線維化がみられた。BPS 0.6 mg/kg/day群ではこれらの変化は軽度であった (Figure 4-6)。

肝臓は対照群においては、広汎な脂肪の肝細胞内小胞への蓄積や肝細胞の風船状変性などの重度な肝脂肪変性がみられた。それに対し、BPS群では脂肪の蓄積や風船状変性を顕著に抑制した。脂肪が蓄積した領域を空胞部分として定量解析したところ、BPS 0.2ならびに0.6 mg/kg/day群で有意に改善していた (Figures 4-7A, 4-7B)。

脂肪組織における脂肪細胞は対照群においてlean群と比較して顕著に肥大していた。一方、BPS 0.6 mg/kg/day群では全体的に肥大が軽度であり、かつ肥大がみられた脂肪細胞も少なかった (Figure 4-8)。

腎臓に関しては、lean群と比較して、対照群では糸球体において、メサンギウム領域の拡大や分節性硬化が散見された (Figure 4-9A)。尿細管においても、軽度の萎縮、間質の線維化ならびに炎症性細胞の浸潤などの障害が散見された (Figure 4-9A)。これらの変化は0.2ならびに0.6 mg/kg/day群では軽減していた。すなわち、障害度のスコア化による半定量解析において、BPS 0.2ならびに0.6 mg/kg/day群の糸球体障害スコアなら

びに尿細管スコアは対照群と比較して有意に低値であった (Figure 4-9B)。

4.4 考察

本章の研究は、肥満より発症した糖尿病の諸病態に対するプロタサイクリン誘導体BPSの作用を明らかにする目的で実施した。本評価は、遺伝的な肥満要因から2型糖尿病を発症し、第3章においてヒトの肥満型2型糖尿病の諸病態と類似していることが確認されたZuckerラットモデル系を用いて実施した。

Zuckerラットは投薬を開始した7週齢から19週齢にかけて、体重、血糖、血中トリグリセライド、血中総コレステロール、尿中総タンパクならびに尿中NAGの増加、血圧上昇ならびに耐糖能の異常がみられ、試験期間中にヒトの病態と同様に、メタボリックシンドロームから糖尿病さらに二次的な腎障害へと進行していた。また、インスリンは初期には上昇して高インスリン血症を呈していたがのちに低下し、膵臓の疲弊とともに分泌能が低下し糖尿病が重度に進行していると考えられた。

BPSはこれらに対し、特に血糖、インスリン、血中トリグリセライドおよび総コレステロール、尿中総タンパクおよびNAG、血圧の上昇を抑制し、耐糖能異常とインスリン抵抗性の進展を改善した。病理組織学的解析において、BPSは肝脂肪変性、脂肪細胞の肥大、膵臓ランゲルハンス氏島の線維化、ならびに腎障害の進展を抑制した。

このように、BPSは腎障害だけでなく、糖尿病の発症と進展に対して抑制作用を有することを新たに見出した。本作用にはおそらく耐糖能異常改善作用ならびにインスリン抵抗性改善作用が寄与していると考えられた。以下これらの詳細について考察する。

インスリン抵抗性は糖尿病の進展に中心的な役割を担っている。骨格筋肉、肝臓ならびに脂肪組織はインスリン反応器官としてグルコースの利用に深く関わっていることから、インスリン抵抗性にも密接に関係している。血中のグルコースや脂肪濃度が増加すると、筋肉や肝臓へのグルコースの取り込み能は低下する^{44), 57)-60)}。脂肪組織に

においては、脂肪の過剰蓄積による脂肪細胞の肥大やマクロファージなどの炎症性細胞の浸潤と一致してTNF- α やMCP-1といったサイトカインの分泌が増加する。これらの変化はインスリンシグナルを低下させることが示唆されている^{61), 62)}。

インスリン抵抗性によってインスリンの作用が減弱すると、グルコースや脂肪の代謝異常が起こり、さらなる糖尿病の進展を引き起こす。従って、糖尿病の進展を抑制するためには、インスリン抵抗性を改善することが重要であると考えられる。

Zuckerラットモデルの血液パラメータ解析において、BPSがインスリン抵抗性を改善することによって糖尿病の進展を抑制する可能性が示唆された。この新知見の基盤となるBPSの作用メカニズムは明らかではないが、以下の仮説を考えた。

糖尿病患者において、血管内皮からのNOの産生量減少により血管反応性は低下し、毛細血管の構造ならびに機能障害と血流量の低下を引き起こす^{63), 64)}。Zuckerラットにおいてもインスリン抵抗性に加え、筋肉における毛細血管密度、血流量、インスリン刺激性グルコース代謝は、血管におけるプロスタサイクリンの合成やeNOSの活性低下に伴って低下する^{47), 65), 66)}。さらに、Zuckerラットにポリフェノールを投与してeNOSを活性化しスーパーオキシドアニオン遊離量を減少させると、血管における内皮細胞依存性の弛緩反応が回復したという報告もある⁴⁸⁾。これらの知見より、微小血管障害とともに、eNOS活性の低下によってNOの産生量が減少することは、糖尿病状態の悪化、特にインスリン抵抗性の進展に密接に関係すると考えられる。従って、プロスタサイクリンが減少すると、直接的あるいは間接的にNOの産生が低下し、インスリン抵抗性を促進すると推察される。

BPSはプロスタサイクリン誘導体であり、血管平滑筋に直接作用して血管拡張を引き起こすとともに、血管内皮細胞におけるeNOSのmRNA発現を誘導することによりNOの産生を増加させ、間接的に血管を拡張させる^{53), 54)}。ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルにおいてBPSは内皮細胞におけるNO産生減少を改善することが報告されており、

また、高グルコースなどの細胞毒性物質から血管内皮細胞を保護することも知られている^{67), 68)}。

さらに、糖尿病は、筋肉においてエネルギー供給に必要な脂肪酸酸化やエネルギー消費が増加することによっても改善することが知られている⁶⁹⁾。Zuckerラットモデルでも熱産生やエネルギー消費量の増加によりインスリン抵抗性が改善することが報告されている⁷⁰⁾。本章の研究において、BPS投与後皮膚温度が上昇したことから、筋肉血流量が増加したと考えられた。従って、BPSの持つ血管拡張作用、内皮細胞保護作用、NO産生促進作用などによって骨格筋の血流が増加し、熱産生とエネルギー代謝を増加させて皮膚温を上昇させるとともに、インスリン抵抗性を改善したと考えられる。

脂肪細胞もまた、エネルギー代謝に中心的な役割を担い、インスリン依存的に遊離脂肪酸を取り込むことによって、エネルギーを貯蔵することができる。しかしながら、高脂質血症により貯蔵脂肪酸量が増加して脂肪細胞が肥大化すると性質が変わり、抗糖尿病ホルモンと言われているアディポネクチン産生量が減少する。さらに、浸潤したマクロファージがMCP-1やTNF- α などのサイトカインを産生し、これらがインスリン抵抗性の悪化に密接に関連していると考えられている。本章の血液パラメータならびに病理組織学的解析により、Zuckerラットにおける血中のトリグリセライドの上昇と脂肪細胞の肥大をBPSが抑制することを明らかにした。Zuckerラットにおいて、血中のMCP-1やTNF- α レベルが増加することが報告されているが^{71), 72)}、BPSは別モデルにおいてMCP-1やTNF- α の産生抑制作用を示すことが確認されている^{73), 74)}。また、脂肪細胞において、プロスタサイクリンの産生が増加すると、脂肪分解作用が亢進する⁷⁵⁾。これらの知見より、BPSは脂肪細胞肥大化を抑制し、MCP-1やTNF- α などの悪化因子の産生を抑制することにより、インスリン抵抗性を改善したと推察される。

近年、BPSがperoxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) を活性化させるという報告もある⁷⁶⁾。PPAR- δ アゴニストである GW501516 は骨格筋における脂肪酸酸化を

促進し、インスリン抵抗性と肥満を改善すると考えられている⁶⁹⁾。従って、Zuckerラットにおいて示されたBPSのインスリン抵抗性改善作用にはBPSのPPAR- δ 様作用が寄与している可能性がある。

病理組織学的解析において、BPSがインスリン抵抗性などの機能障害を改善するだけでなく、ヒト糖尿病患者の特徴である膵臓、肝臓、腎臓の組織障害も改善することを明らかにした。Zuckerラットの膵臓では、インスリン抵抗性に起因した持続的なインスリン分泌量の増加によって考えられるランゲルハンス氏島の障害がみられたが、BPS投与により改善していた。これは、血管内皮障害抑制作用などによるBPSの直接的な膵臓の保護作用と、インスリン抵抗性を改善することによるインスリン分泌の改善といった間接作用の両者によって膵臓の線維化を改善したのではないかと考えられる。

肝脂肪変性は肥満型2型糖尿病患者でしばしばみられることが知られており、前述のようにインスリン抵抗性に深く関わっている。本章の病理組織学的解析において、Zuckerラットの肝細胞では脂肪が蓄積してできた空胞がみられたが、BPS投与により改善した。BPSは高血糖、高脂質血症を抑制し、インスリン抵抗性を改善するため、これらの働きが肝脂肪変性の進展の抑制に総合的に関わっていると考えられる。さらに、肝細胞への直接的な保護作用も肝脂肪変性の改善に寄与している可能性がある⁷⁷⁾。

糖尿病性腎症は糖尿病患者でみられる主要な合併症の一つである。序論で述べたように腎症を発症して腎不全に至ると生命予後に大きく影響を与えることから、糖尿病患者にとって、腎障害の進展を抑制することは非常に重要である。本章の病理学的解析において分節性硬化やメサンギウム領域の拡大などの糸球体障害、軽度の尿細管の萎縮、間質の線維化などの尿細管障害や炎症性細胞の浸潤といった、ヒトの糖尿病性腎症患者においてみられる特徴的な組織学的変化が観察された。これらの変化はBPS投与により有意に改善されたが、本作用は、別モデルで報告されているBPSの抗炎症作用、抗線維化作用が関与している可能性がある^{12), 74)}。また、Zuckerラットにおいて腎障

害とともに腎臓におけるeNOS発現量の減少がみられることが知られている⁷⁸⁾。

L-NAME 投与によりNO産生を阻害すると、腎臓障害が発症するという報告もある⁷⁹⁾。

このように、NO産生の減少は腎障害の進展にも関わっていることから、BPSはNOの産生を増加させることにより糖尿病性腎症の進展を抑制している可能性がある。また、Zuckerラットにおいて、インスリン抵抗性も腎障害に関連していることから⁸⁰⁾、BPSによるインスリン抵抗性改善作用も腎障害の進展抑制に寄与している可能性がある。さらに、他の肥満型糖尿病モデルOLETFラットにおいて、BPS投与により腎障害が改善されたという報告もある⁸¹⁾。本報告では観察期間中、血糖の顕著な上昇がなかったことから、BPSは血糖低下作用以外のメカニズムによって腎障害を改善したと考えられる。緒言で述べたように、GKラットにおいて腎臓に対する直接作用により腎障害を改善した可能性が示唆されている。また、糖尿病以外の腎不全期モデルラットにおいてもBPSの腎障害抑制作用が報告されている^{74), 82)}。従って、Zuckerラットモデルにおいて、BPSは糖尿病の改善によって腎障害の進展を抑制しただけでなく、腎障害に対する直接作用も関与していると考えられる。BPSはZuckerラットでみられる高血圧状態を抑制し、lean群と同程度に維持した。ヒト糖尿病患者では血圧上昇と腎障害がみられ⁸³⁾、相互に影響を及ぼしていると考えられている^{84), 85)}。従って、BPSの血圧上昇抑制作用も腎障害の進展抑制に関与していると考えられる。

他のインスリン抵抗性改善作用を有する抗糖尿病薬と同様に^{86), 87)}、BPSは体重を軽度増加させたにもかかわらず、高血糖、高脂質血症などの糖尿病の諸病態を改善した。BPS投与により摂餌量の増加や浮腫はみられなかったことから、軽度な体重増加はおそらくBPS投与によりインスリン抵抗性やグルコースの利用能が改善し、インスリン反応器官への貯蔵などが正常に行われたためと考えられた。

以上の考察を総合してBPSの作用を模式図に示した (Figure 4-10)。ヒトの肥満型2型糖尿病の諸病態に類似していることを確認したZuckerラットを評価に用いることによ

り、BPSが肥満型2型糖尿病においても腎障害を改善することを明らかにした。それだけでなく、肥満型糖尿病の血液パラメータ、インスリン抵抗性、耐糖能異常、血圧上昇などの諸病態や、膵臓、肝臓、脂肪組織の組織障害を改善することを初めて明らかにすることができた。GKラットを用いた解析結果と併せると、BPSは2型糖尿病性腎症に対して、腎障害に対する直接作用と、糖尿病の改善による間接作用により総合的に腎障害を改善していると考えられた。また、BPSによるインスリン抵抗性の改善は、これら諸病態の改善に寄与していること、血流増加によるエネルギー代謝の亢進がインスリン抵抗性の改善に深く関わっている可能性が示唆された。従って、BPSは糖尿病に対する改善作用を併せ持つ、糖尿病性腎症治療薬として期待できる薬物であると考えられる。

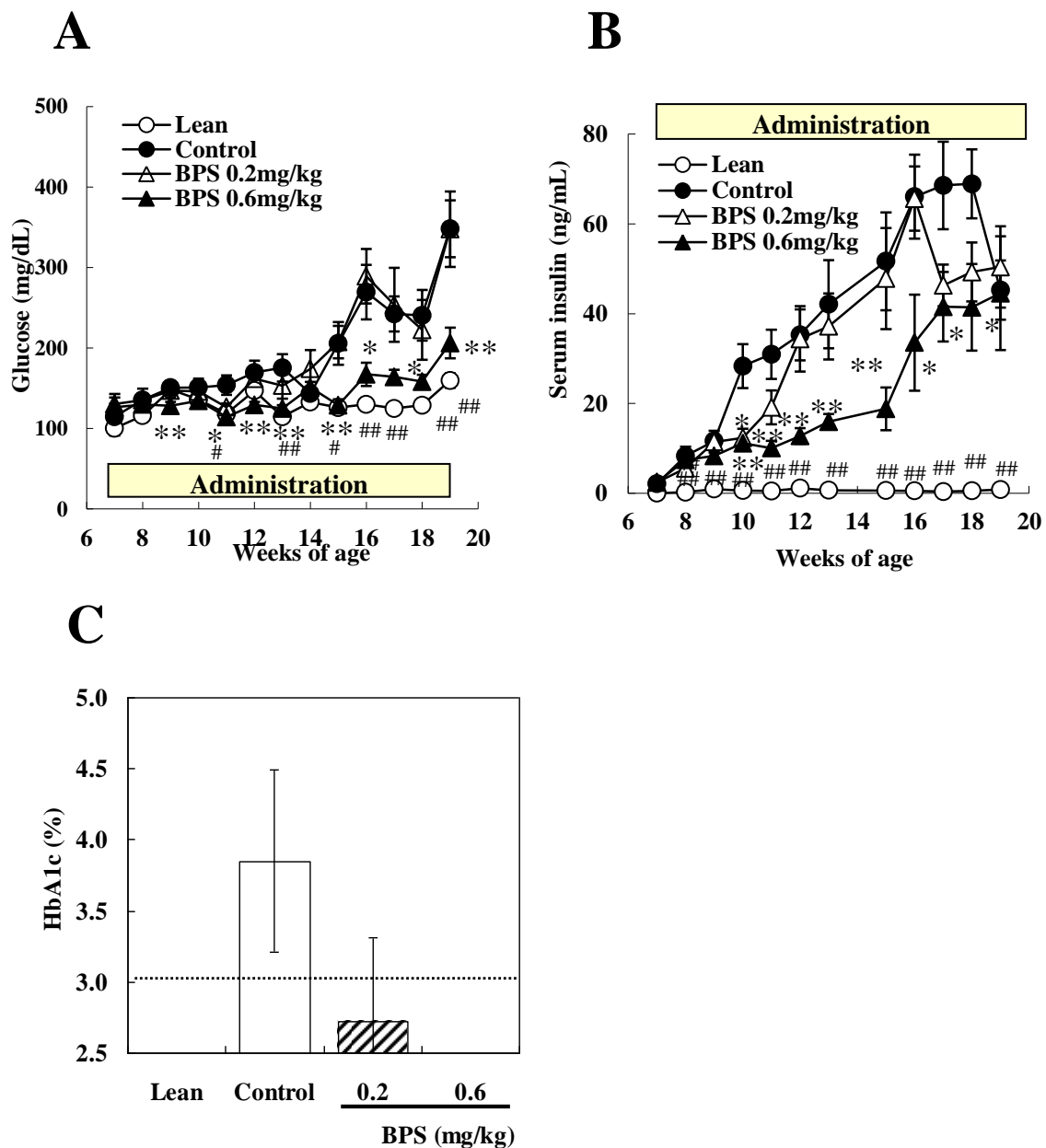
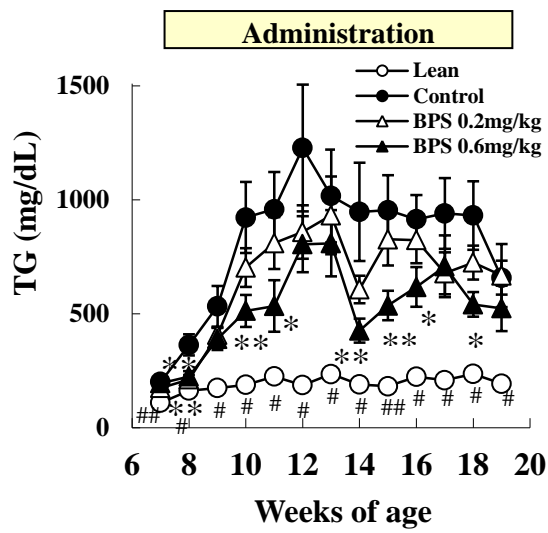


Figure 4-1 Serum glucose (A), insulin (B), HbA1c (C), triglyceride (D), and total cholesterol (E) in control obese Zucker rats (●), obese Zucker rats treated with BPS (△ ; 0.2 mg/kg/day, ▲; 0.6 mg/kg/day), and Zucker lean rats (○) as line graph, and control obese Zucker rats (□), Zucker rats treated with BPS (▨ ; 0.2 mg/kg/day, ■; 0.6 mg/kg/day), and Zucker lean rats (▤) as bar graph. Data are mean± SE of 7-8 rats. * P <0.05, ** P <0.01 vs. control rats by non-parametric Williams' test (glucose, insulin, triglyceride and total cholesterol). # P <0.05, ## P <0.01 vs. control by Welch's test (glucose, insulin, triglyceride and total cholesterol)

(continued to next page)

D



E

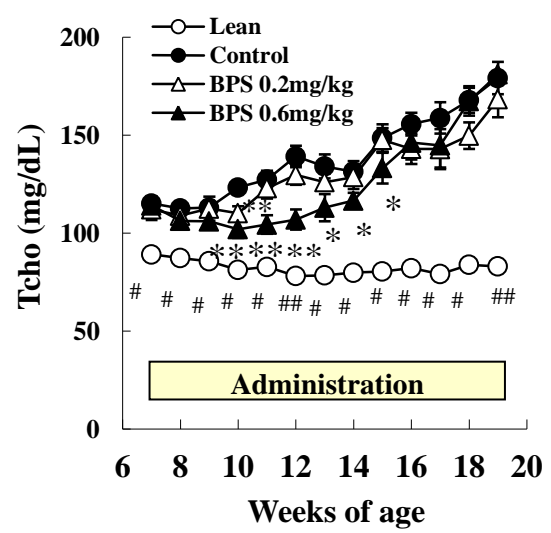


Figure 4-1 (continued)

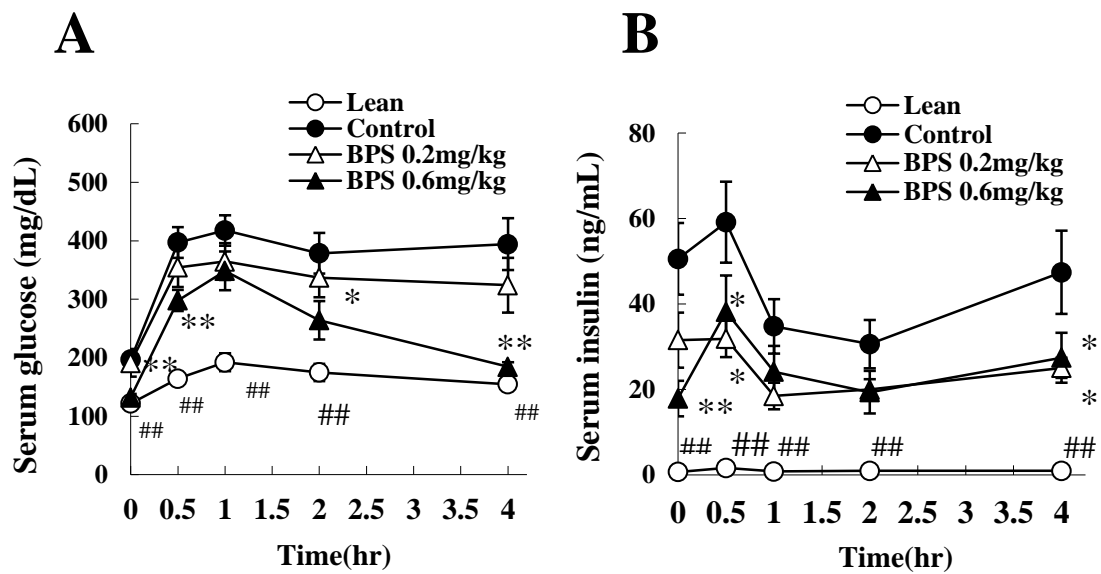


Figure 4-2 Time-course changes in the level of serum glucose (A) and insulin (B) during oral glucose tolerance test (OGTT) in control obese Zucker rats (●), obese Zucker rats treated with BPS (△; 0.2 mg/kg/day, ▲; 0.6 mg/kg/day), and Zucker lean rats (○). Data are mean± SE of 7-8 rats. * P <0.05, ** P <0.01 vs. control rats by non-parametric Williams' test. ## P <0.01 vs. control by Welch's test.

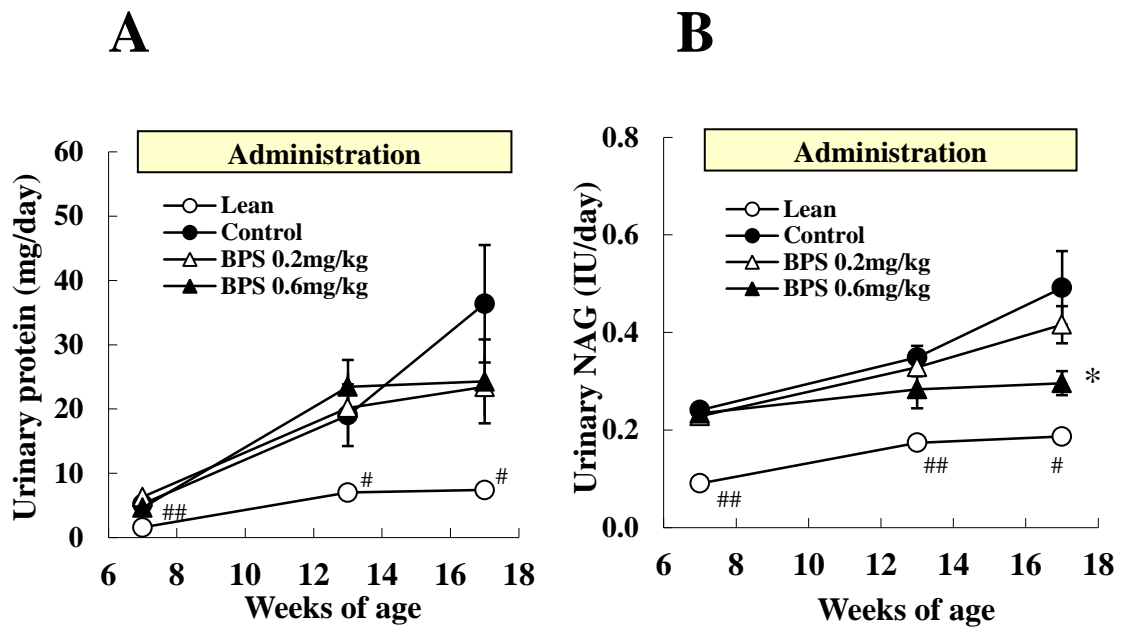


Figure 4-3 Urinary protein (A) and NAG (B) in control obese Zucker rats (●), obese Zucker rats treated with BPS (△; 0.2 mg/kg/day, ▲; 0.6 mg/kg/day), and Zucker lean rats (○). Data are mean± SE of 7-8 rats. * $P < 0.05$ vs. control rats by non-parametric Williams' test (NAG). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. control by Welch's test.

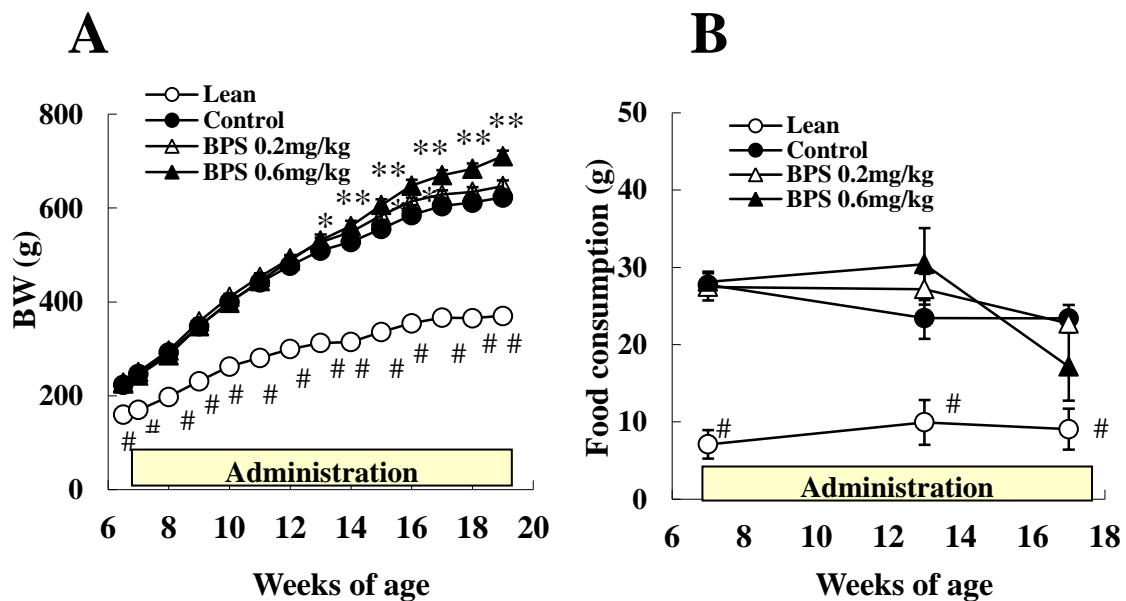


Figure 4-4 Body weight (A) , food consumption (B) , systolic blood pressure (C), and hart rate (D) in control obese Zucker rats (●), obese Zucker rats treated with BPS (△ ; 0.2 mg/kg/day, ▲; 0.6 mg/kg/day), and Zucker lean rats (○) as line graph, and control obese Zucker rats (□), Zucker rats treated with BPS (▤ ; 0.2 mg/kg/day, ■; 0.6 mg/kg/day), and Zucker lean rats (▨) as bar graph. Data are mean± SE of 7-8 rats. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control rats by parametric Williams' test (Body weight, food consumption, and SBP). # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs. control by t test

(continued to next page)

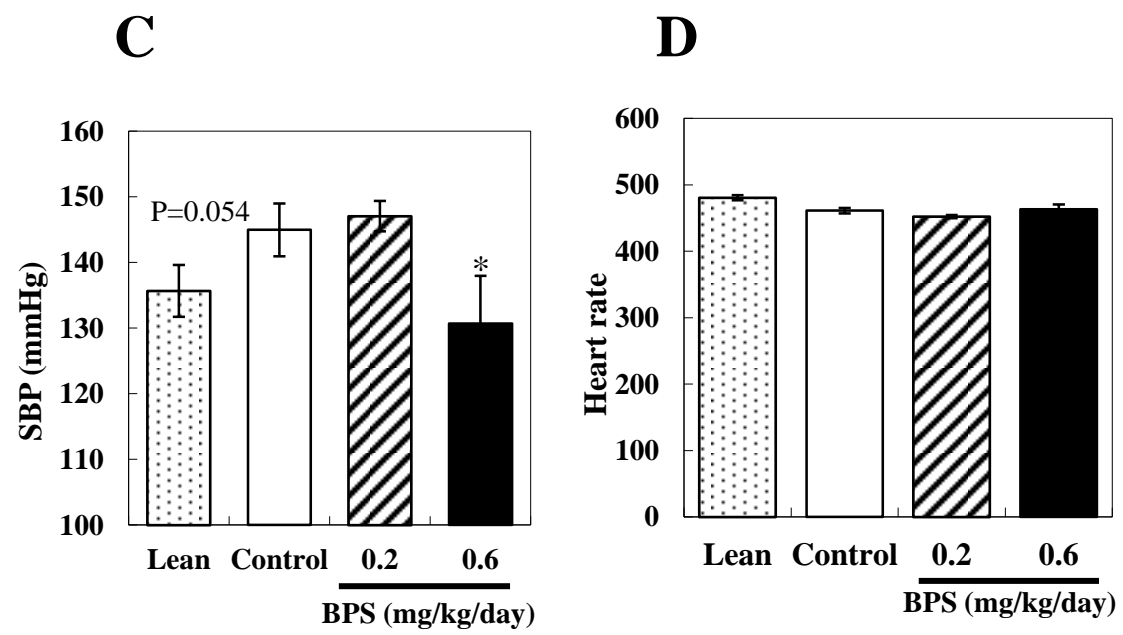


Figure 4-4 (continued)

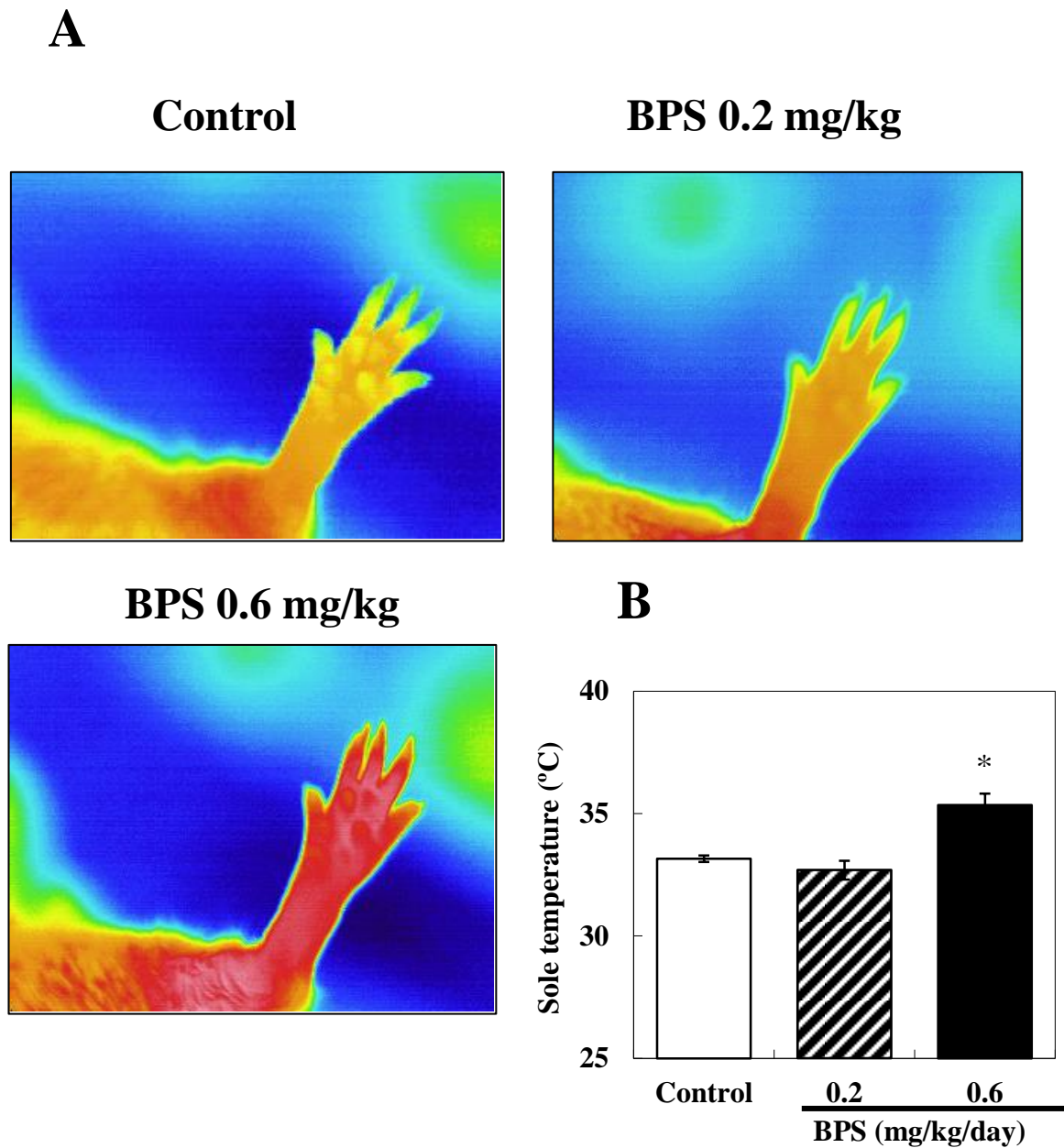


Figure 4-5 The level of sole temperature after administration.

(A) Representative thermal images of each groups at 2 hour after administration. (B) Sole temperature at 2 hours after administration in control obese Zucker rats (\square) and obese Zucker rats treated with BPS (\square/\square ; 0.2 mg/kg/day, \blacksquare ; 0.6 mg/kg/day). Data are mean \pm SE of 4 rats.

* $P < 0.05$, vs. control rats by parametric Williams' test.

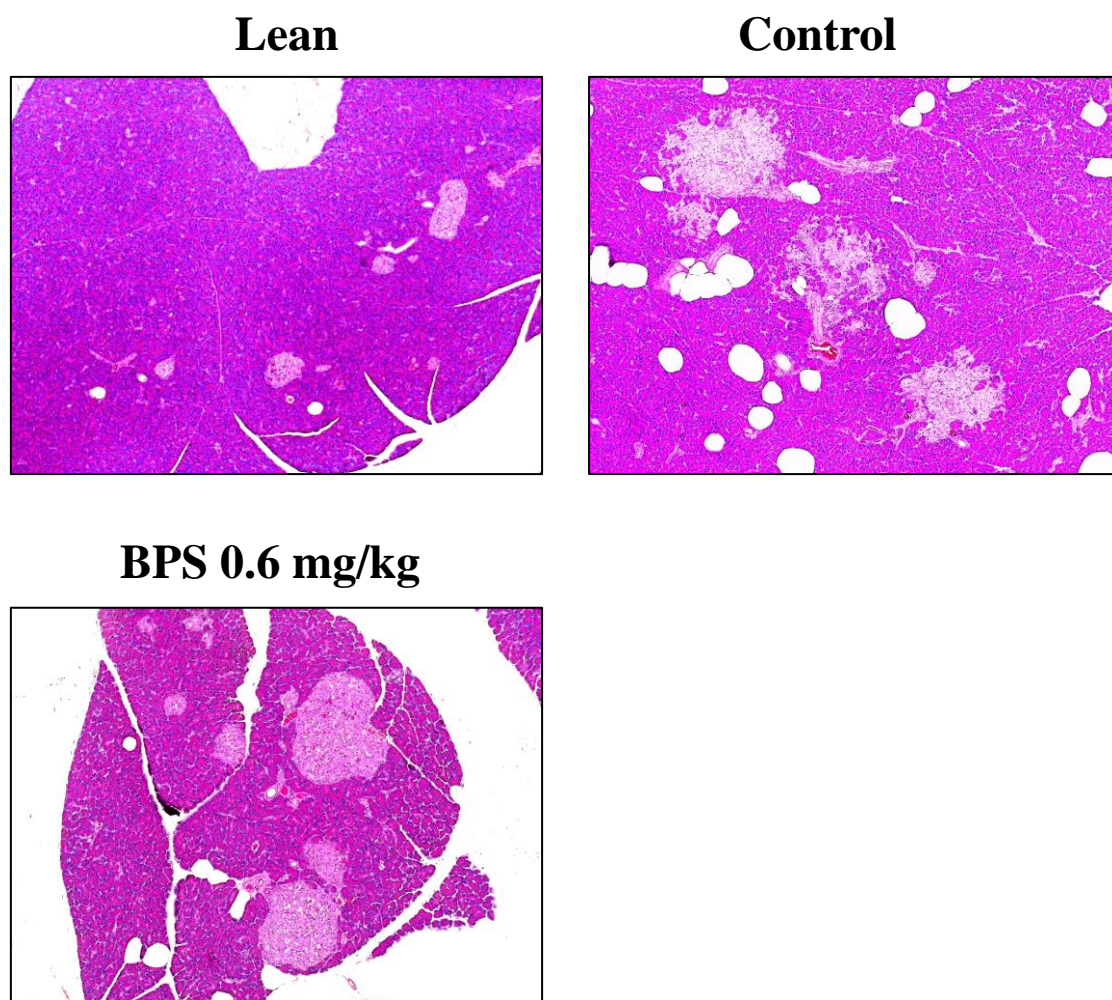


Figure 4-6 Photomicrographs of HE staining of the pancreas in control obese Zucker rats, obese Zucker rats treated with high-dose of BPS, and Zucker lean rat (magnification $\times 20$).

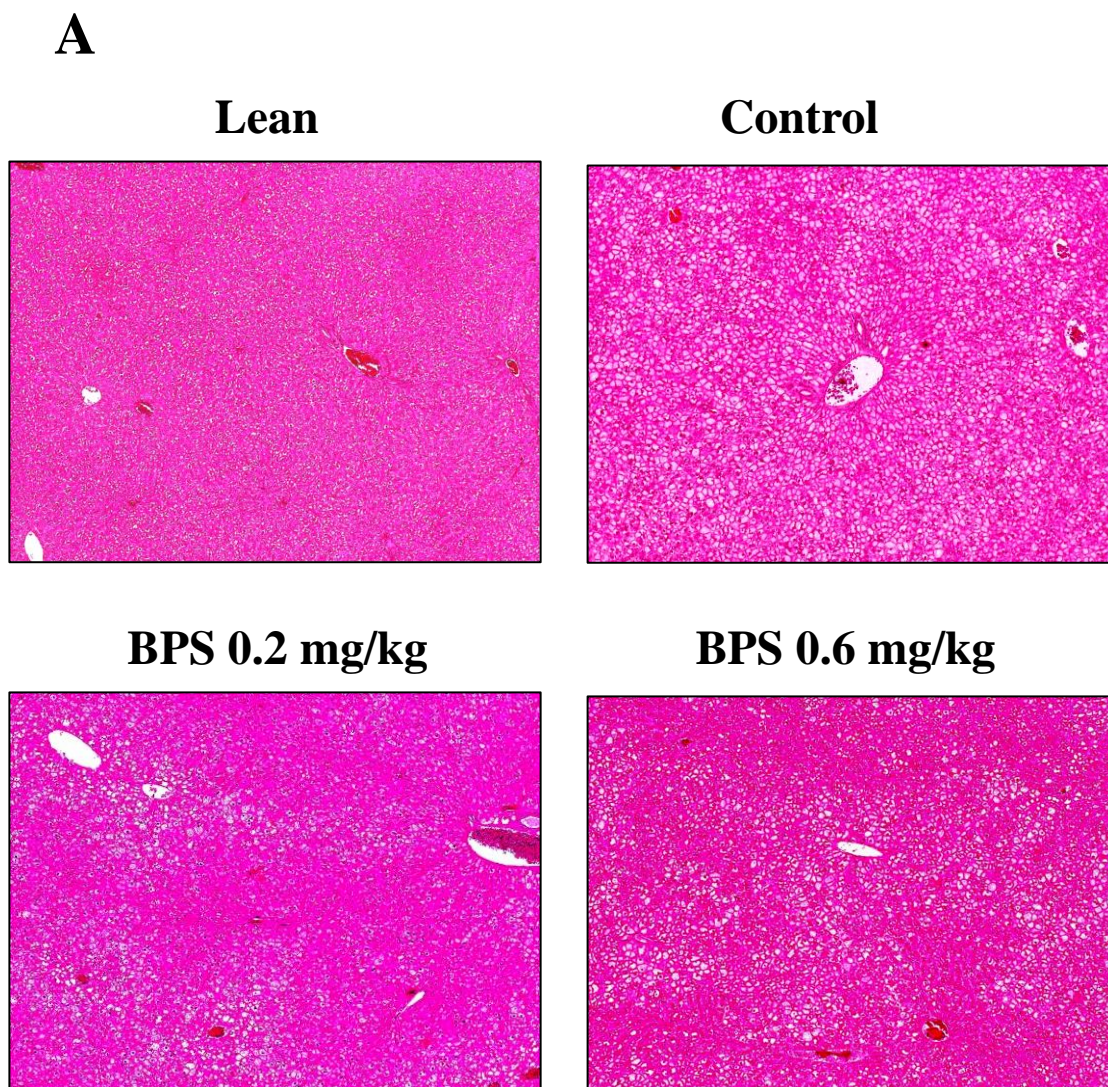


Figure 4-7 Photomicrographs of HE staining of the liver in control obese Zucker rats, obese Zucker rats treated with BPS, and Zucker lean rat (A) (magnification $\times 20$) and quantitative analysis of vesicles in control obese Zucker rats (\square) and obese Zucker rats treated with BPS (\square ; 0.2 mg/kg/day, \blacksquare ; 0.6 mg/kg/day) (B). Data are mean \pm SE of 7-8 rats. **** $P < 0.01$ vs. control by parametric Williams' test.**

(continued to next page)

B

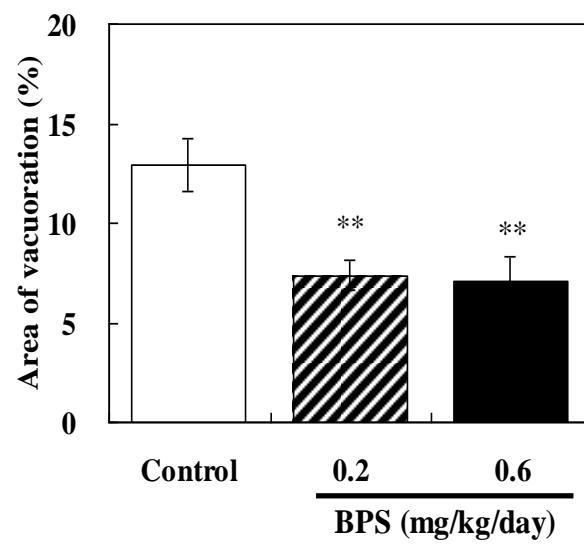
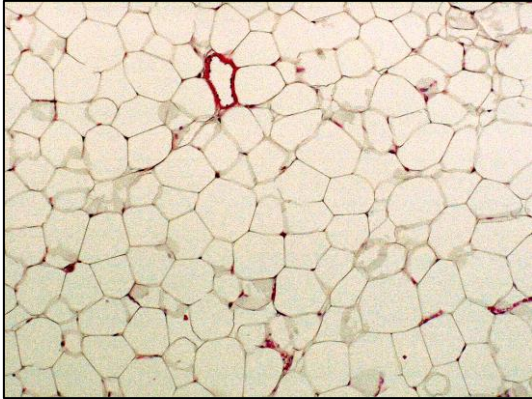
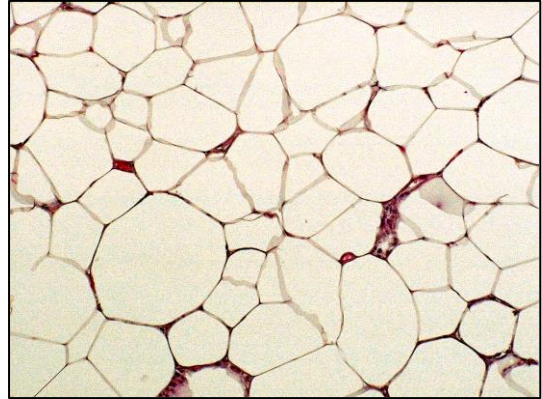


Figure 4-7 (continued)

Lean



Control



BPS 0.6 mg/kg

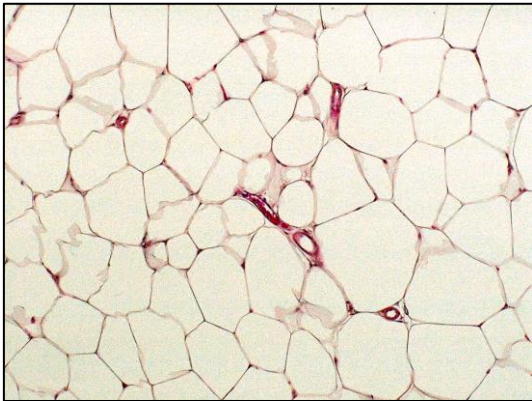


Figure 4-8 Photomicrographs of HE staining of the adipose tissues in control obese Zucker rats, obese Zucker rats treated with high-dose of BPS, and Zucker lean rat (magnification $\times 50$).

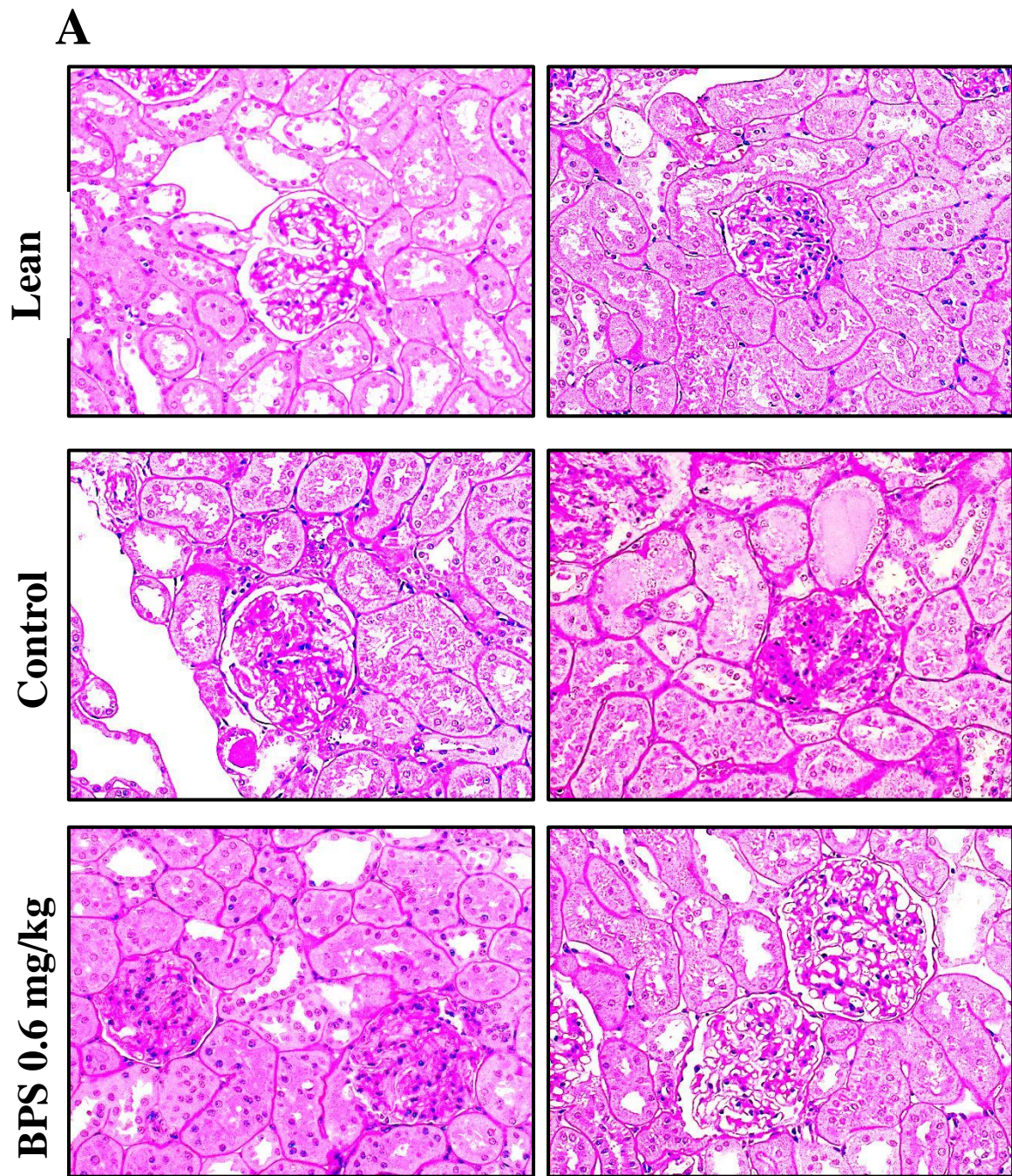


Figure 4-9 Photomicrographs of PAS staining of the kidney in control obese Zucker rats, obese Zucker rats treated with high-dose of BPS, and Zucker lean rat (A) (magnification $\times 100$) and semiquantitative analysis of glomerular (B: left) and tubular (B: right) injuries in control obese Zucker rats (\square), obese Zucker rats treated with BPS (\square ; 0.2 mg/kg/day, \blacksquare ; 0.6 mg/kg/day), and Zucker lean rats (\boxtimes). Data are mean \pm SE of 7-8 rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control by non-parametric Willians' test. $^{##}P < 0.01$ vs. control by Welch's test.

(continued to next page)

B

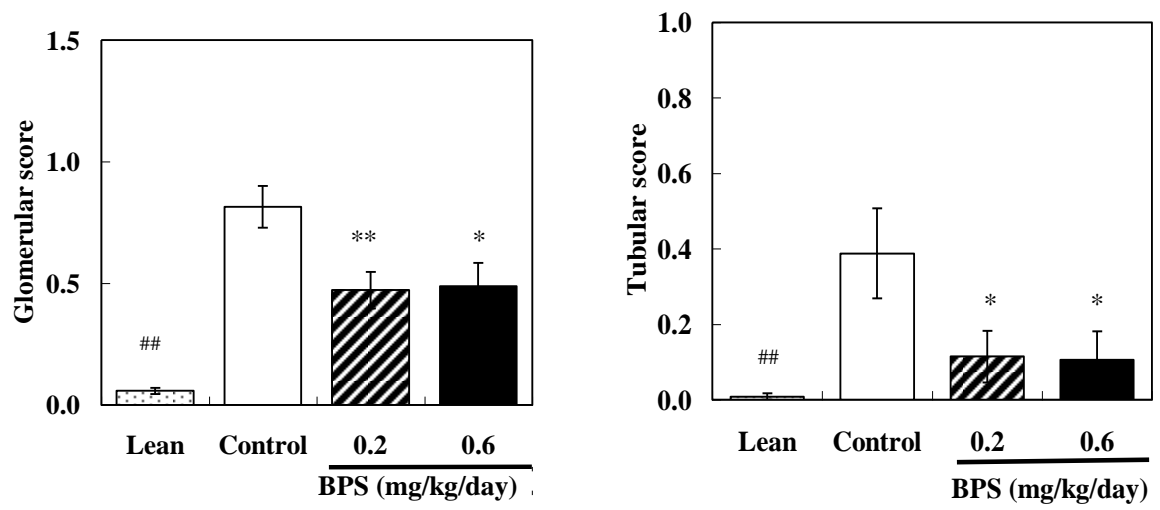


Figure 4-9 (continued)

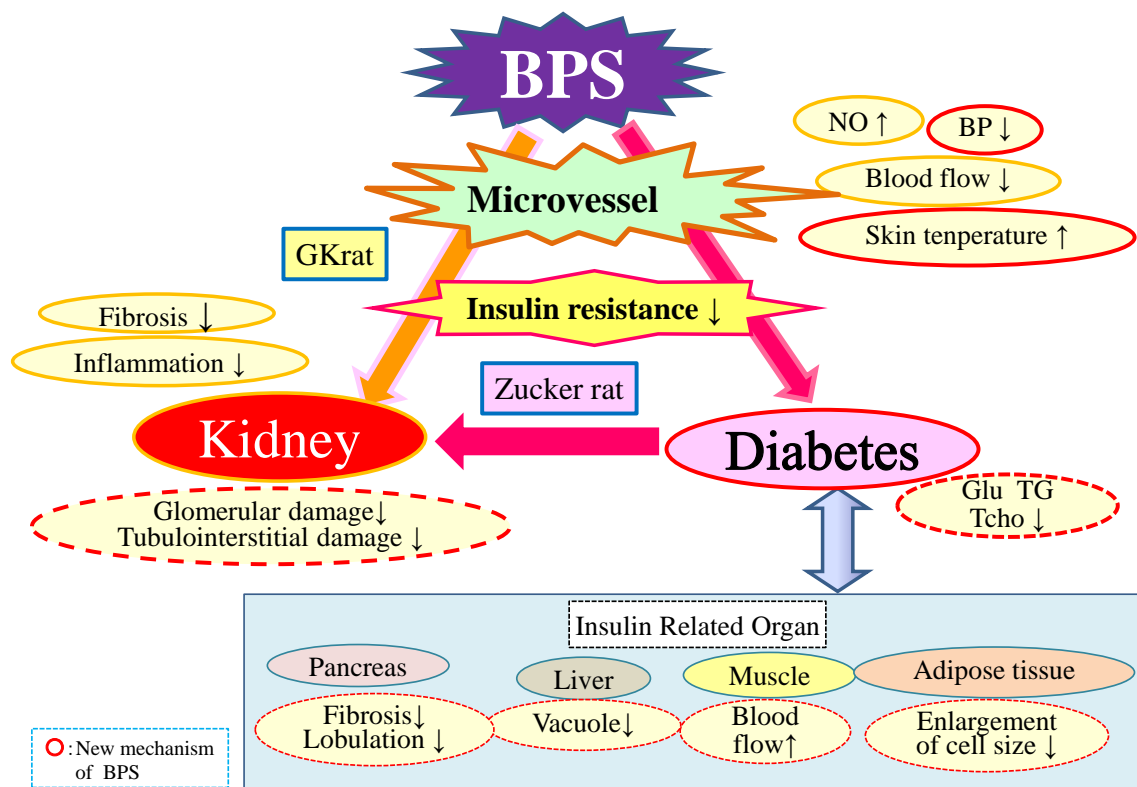


Figure 4-10 Mechanism of BPS against diabetic rat model.

第 5 章 総括

糖尿病は肥満などの生活習慣や遺伝的要因などに起因して発症する慢性疾患である。本疾患は複雑な要因を背景として発症し、心疾患や、腎症などの合併症により深刻な健康上の問題となっている。中でも糖尿病性腎症は糖尿病の長期罹患の後に発症し、個々の患者によりその背景は様々である。そのため、いろいろなメカニズムをターゲットとした薬物の開発が進められているが未だその効果は充分ではなく、透析導入患者の減少が大きな社会的課題となっている。このような背景のもと、本研究の対象疾患は糖尿病性腎症とした。

ベラプロストナトリウム（BPS）はプロスタサイクリン誘導体であり、血管平滑筋弛緩作用、血管平滑筋増殖抑制作用、内皮保護作用を有する。その薬理作用を活かし、すでに、慢性動脈閉塞症に伴う潰瘍、疼痛及び冷感の改善、原発性肺高血圧症および徐放性製剤について肺動脈性肺高血圧症を適応として臨床にて使用されている。本研究において研究対象とした糖尿病性腎症は、糸球体ならびに尿細管間質の障害が特徴であり、病態の進展に血管障害が関わっている、したがって、BPSは糸球体障害に対して、血圧低下により糸球体の負荷を軽減し、また、内皮保護作用により糸球体ならびに尿細管間質の毛細血管を保護することによって、糖尿病性腎症に対して改善作用を示す可能性が期待された。そこで、BPSを候補薬物として糖尿病性腎症に対する有効性を評価した。

研究を実施するに当たり、まず、糖尿病性腎症で効果を示す薬物を見出すための課題と、本研究方針について考えた（第1章）。課題の一つとして、評価系のヒトとの類似性に着目した。すなわち、種々のヒト腎疾患の共通的なスクリーニングパラメータとしては、検査が簡便な尿中タンパクが広く使用されている。しかしながら、臨床においては同じ尿中タンパクの上昇がみられた場合でも、腎疾患の種類によって腎組織の障害の様相は様々であることが知られており、障害の種類によって最適な治療法が異なる。そのため、尿中タンパクが上昇して腎疾患の進展が疑われた場合には、組織

を採取して腎疾患の種類を確認し、適切な治療法を選択している場合が多い。

動物モデルでの薬効評価においても検査が簡便な尿中タンパクが広く使用されている。腎障害の組織学的評価も実施され、ヒト組織障害像との類似性に言及している報告もあるが、尿中タンパクは上昇するものの、腎組織像のヒトとの類似性はあまり高くないモデルもある。このような系で評価していることが、ヒトで有効性を示す薬物を見極めにくい原因の一つではないかと考えた。言い換えると、ヒト糖尿病性腎症に対する有効性を示す薬物を見出すには、ヒトの腎組織障害の特徴にできるだけ類似した疾患動物モデルにて評価する必要があると考えた。

生活習慣に起因した糖尿病性腎症の疾患モデルとしては、大きく非肥満型と肥満型に分けられる。前者により腎臓に対する薬物の直接効果を明らかにし、後者によって原疾患である糖尿病に対する作用も合わせた解析をすれば、BPSの有用性が多角的に評価できると考えた。

非肥満型モデルとしては、予備的な検討によりヒトの腎組織障害の初期病変に類似していたGKラットを第一候補とした。ただし、本モデルは肥満の要因がないため病態の進行が遅く、また12ヶ月齢程度でも、ごく軽度な障害にしか進展しないと言われていた。腎障害がある程度進展した場合の薬物の有用性を評価するために、加速因子付加モデルの作製を試みた報告もあったが、十分な結果が得られていなかったため、本モデルを使用するためには新たな加速因子を見つける必要があった。

ヒトにおいては高血糖状態の長期持続によって徐々に病態が悪化する。また、加齢によっても腎機能が低下する。従ってGKラットにおいても高血糖状態で非常に長期間経過すれば、高血糖および加齢の因子により腎臓障害が進展するのではないかという仮説をたてて検証した（第2章）。その結果、GKラットは24ヶ月齢という非常に長期間高血糖が持続した後には、糸球体硬化、メサングウム細胞の増加ならびに尿細管萎縮、基底膜肥厚、間質線維化といった、ヒト糖尿病性腎症と類似した腎臓組織障害に進展

することを初めて見出した。この新知見に基づき、**GK**ラットはヒト非肥満型糖尿病性腎症に類似したモデルとして適切であると判断し評価系として選択した。

一方、肥満などの生活習慣や遺伝的要因などに起因して発症する肥満型2型糖尿病は複雑な病態を示すが、多くの場合、高血糖、高脂血症とともに耐糖能異常、インスリン抵抗性がみられることが知られている。糖尿病性腎症は合併症の一つであり、糖尿病の諸症状が背景因子となっている。従って、糖尿病性腎症に有効な薬物を見出すには、ヒトの糖尿病の進展から腎障害に至る複雑な病態に対する薬物の効果を明らかにできるような肥満型糖尿病モデルが必要だと考えた。モデルの選定においては、糖尿病の諸症状と腎組織障害像がヒトと類似しているかどうかを判断基準とした。**Zucker**ラットは文献的にヒトと類似した尿・血液パラメータ推移を示すと言われており、また、本研究の事前に実施した予備検討において腎臓組織障害の初期病変がヒトと類似していることが確認できたため、**Zucker**ラットをモデル候補として、一定期間解析を継続してヒト糖尿病との類似性を解析した（第3章）。

Zuckerラットは徐々に病態が進展して、肥満に起因した高血糖、高インスリン血症、高脂血症など、ヒトの糖尿病と類似した複雑な病態を示した。また、腎臓に関しては、尿中タンパクの上昇のみならず、病理組織学的解析において、糸球体硬化、尿細管の萎縮、基底膜肥厚、間質の線維化や炎症性細胞など、ヒト糖尿病性腎症の進行期と類似した腎臓組織障害像を示すことが確認された。そこで、糖尿病性腎症とともに原疾患である糖尿病に対する作用も合わせて評価できる系として、**Zucker**ラットを選択した。

以上のように、組織学的解析の手法を取り入れることにより、尿・血液パラメータのみならずヒトと類似した腎組織障害に対する薬物の直接効果を明らかにするための非肥満型糖尿病性腎症モデル**GK**ラットと、原疾患である糖尿病に対する作用を含めた糖尿病性腎症に対する有用性が多角的に評価できる肥満型糖尿病性腎症モデルとして、**Zucker**ラットを見出すことができた。これら2種のモデルは、モデル系選択において設

定していた目標をクリアできたことから、本研究だけでなく、今後糖尿病性腎症に有用な薬物を効率よく選定できる系として広く活用されることを期待している。

次に、上記2種のモデル系を用いて、**BPS**の糖尿病性腎症に対する有用性を評価した(第4章)。評価に当たっては、まず**GK**ラットを用いて**BPS**の腎障害に対する直接作用を明らかにし、次に**Zucker**ラットを用いて、糖尿病から腎障害に至る複雑な過程への作用を明らかにした。

非肥満型2型糖尿病モデル**GK**ラットにおいては第2章および第4章で明らかにしたように長期観察が必要なことから、腎臓組織障害が進展する24ヶ月齢まで**BPS**を投与して薬効を解析した。**BPS**は腎組織障害に関して、糸球体硬化や尿細管間質線維化など、ヒトの糖尿病性腎症において特徴的な障害を抑制した。すなわち、**GK**ラット評価系を用いることにより、**BPS**が糖尿病性腎症において、肥満などの因子を除外した高血糖のみに伴う腎組織障害の進展を直接的に抑制できる可能性を明らかにすることができた。

肥満型糖尿病性腎症モデルとしては、ヒトと類似した糖尿病の病態進展ならびに腎障害の発症が確認されたため(第3章)、**Zucker**ラットモデル系を用いた評価を行った(第4章)。**Zucker**ラットでの解析結果より、**BPS**は血糖、インスリン、**HbA1C**、トリグリセライド、総コレステロールならびに血圧の上昇を抑制し、耐糖能異常とインスリン抵抗性の進展を改善した。病理組織学的にも、**BPS**はインスリン抵抗性など、インスリンに関係した肝脂肪変性、脂肪細胞の肥大ならびに膵臓ランゲルハンス氏島の線維化の進展を抑制し、糖尿病そのものに対しても進展抑制作用を示すことを初めて明らかにできた。腎組織障害に対しては、腎障害パラメータである尿中タンパク、**NAG**の上昇を抑制し、また、**GK**ラットと同様に、糸球体硬化やメサンギウム領域の拡大などの糸球体障害や、尿細管の萎縮、間質の線維化などの尿細管障害ならびに尿細管間質への炎症性細胞の浸潤など、ヒト糖尿病性腎症で特徴的にみられる腎組織障害の進展を改善した。これらの改善作用には、**BPS**のインスリン抵抗性改善作用が関わっており、ま

た、BPSによる血流増加によるエネルギー代謝の亢進がインスリン抵抗性改善作用に何らかの役割を担っていることが推察された。

以上のように、研究を始めるにあたって薬効メカニズムより期待されたように、BPSはヒト糖尿病性腎症の腎組織障害の進展を直接抑制することが明らかになった。さらに、BPSは糖尿病の諸病態についても改善し、糖尿病の改善による間接的な腎障害の進展抑制作用を併せ持つことも新たに明らかになった。評価に使用したモデルはヒト糖尿病性腎症との類似性が高いものを選択したことから、BPSはヒトでもラットモデルと同様の有効性を示すことが期待された。すでに、BPSの腎障害への有効性を示唆する臨床解析結果もあることから^{88), 89)}、ヒト病態に類似するモデルでの評価はヒトでの効果を外挿する上で有用性が高いと考えられる。

最後に、本章ではBPSの臨床における特徴付けをするために、すでに臨床において糖尿病性腎症で有効性が報告されている市販薬との比較を行った。「一般社団法人 日本腎臓学会編: エビデンスに基づくCKD 診療ガイドライン2013」に掲載されている薬剤の糖尿病性腎症に対する有効性のデータと、それぞれの薬剤のインタビューフォームの情報を抜粋し、表にまとめた (Table 5-1, 5-2)⁹⁰⁾⁻⁹⁶⁾。ガイドラインに示されていた薬剤6種はいずれも高血圧に関わるレニン-アンジオテンシン系への抑制作用を示し、臨床適応は各種高血圧であった。さらに、ロサルタンは高血圧及び蛋白尿を伴う2型糖尿病性腎症も適応であった。糖尿病性腎症は腎症前期、早期腎症期、顕性腎症期を経て腎不全に至るが、これらの薬剤はいずれも、次のステージへの移行を抑制していた。

従って、BPSはすでに臨床で使用されている薬剤とは異なるメカニズムにより、腎障害の進行を抑制する有用な薬剤として併用または単独で活用できる可能性が期待された。特に、糖尿病由来の腎疾患に対しては有用性を示す可能性ある。また、すでに適応となっている疾患へBPSを使用する際には症状（顔面紅潮、頭痛など）を観察しながら

ら漸次増量することになっており、新たな疾患へ適応する際にも同様の使用方法が考えられる。

以上のように本研究は、糖尿病性腎症という有用な治療薬がない疾患において、有効性が期待される新たな候補薬物の可能性を示すものである。また、本研究で構築した2種の評価系はヒトへの外挿性の高いモデルであり、今後の新たな糖尿病性腎症の候補化合物の創出において広く活用できる有用な評価系であると考えている。これらの研究結果が広く活用されて今後の糖尿病性腎症治療薬の開発の一助となり、健康長寿社会に貢献することを願っている。

**Table 5-1 ヒト腎疾患に有効性を示す薬物
(Information of drugs effective against human renal diseases).**

商品名	化合物名	分類	適応
オルメテック錠	オルメサルタン	ARB	高血圧症
ミカルディス錠	テルミサルタン		
ニューロタン錠	ロサルタン		高血圧症 高血圧及び蛋白尿を伴う 2型糖尿病性腎症
レニベース錠	エナラプリル	ACE	本態性高血圧症 悪性高血圧 腎性高血圧症 腎血管性高血圧症
カプトリル錠	カプトプリル		
ラジレス錠	アリスキレン	DRI	高血圧症

ARB：アンジオテンシン受容体拮抗薬 (Angiotensin II Receptor Blocker)

ACE：アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (Angiotensin Converting
Enzyme inhibitor)

DRI：直接的レニン阻害薬(Direct Renin Inhibitor)

Table 5-2 ヒト腎疾患に対する市販薬の治療効果
(Therapeutic effect of commercial drugs against
human renal diseases)

病期分類	化合物名	腎障害改善作用	糖尿病 改善効果
腎症前期	オルメサルタン ¹⁾	微量アルブミン尿 発現期間延長	HDL 上昇 LDL 低下 血糖不変 インシュリン 不変
早期腎症期	テルミサルタン ¹⁾	顕性腎症期への移行抑制 腎血流量、糸球体濾過率不変	—
	エナラプリル ²⁾	尿中タンパク排泄量低下	—
	アリスキレン ³⁾	アルブミン尿低下	—
顕性腎症期	カプトプリル ²⁾	Cr 倍化頻度低下 透析導入率・死亡率低下	—
	ロサルタン ¹⁾	アルブミン尿低下 Cr 倍化頻度低下 透析導入率低下	—

1) ARB 2) ACE 3) DRI

引用文献

1. “21 世紀における国民健康づくり運動（健康日本 21）について（報告書） 各論 7. 糖尿病”，厚生労働省. 2000 年 2 月.
http://www1.mhlw.go.jp/topics/kenko21_11/b7.html#A71 （参照：2015 年 10 月 9 日）
2. “平成 25 年国民健康・栄養調査結果の概要”，厚生労働省 2014 年 12 月 9 日.
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000067890.html> （参照：2015 年 10 月 9 日）
3. 安孫子 亜津子, 羽田 勝計: 糖尿病性腎症の疫学と病態. MEDICINAL 2012; 2(2): 6-7.
4. 一般社団法人 日本透析医学会 統計調査委員会: わが国の慢性透析療法の現状. 一般社団法人 日本透析医学会 2013 年 12 月.
<http://docs.jsdt.or.jp/overview/index.html> （参照：2015 年 10 月 9 日）
5. 坂井 建雄: Primers of Nephrology -1 初心者のための腎臓の構造. 日腎会誌 2001; 43(7): 572-579.
6. 糖尿病性腎症ならびに腎硬化症の診療水準向上と重症化防止にむけた調査・研究 研究班: 糖尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引き. 東京医学社 2014, 69p.
7. Gilbert R, Cooper M: The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? Kidney Int 1999; 56(5): 1627-1637.
8. Nath K: The tubulointerstitium in progressive renal disease. Kidney Int 1998; 54(3): 992 -924.
9. Viberti G, Hill R, Jarrett R, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H: Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 1982; 1(8287): 1430-1432.
10. Mogensen C: Renal function changes in diabetes. Diabetes 1976; 25(Suppl. 2): 872-879.
11. 糖尿病性腎症合同委員会報告：糖尿病性腎症病期分類 2014 の策定（糖尿病性腎症病期分類改訂）について. 日腎会誌 2014; 56(5): 547-552.

12. 牛首 文隆: “プロスタサイクリンの多様性と今後の展望”. 第 I 章 プロスタサイクリンの基礎 1. プロスタサイクリンとは. メディカルビュー社, 2002; 18-27.
13. 中野 元 山 純一: PGI₂ 誘導体制剤ベラプロストナトリウムの可能性を探る *Prog. Med.* 2007; 27; 339-352.
14. 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方 ベラプロストナトリウム, 東レ株式会社／アステラス製薬株式会社, 2015 年 7 月改訂(第 9 版).
15. Sato N, Suzuki M, Kurumatani H, Matsushita T: Structural and functional changes in kidney in drug (STZ)-induced diabetic rats and spontaneous NIDDM GK rats. The 74th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society 2001.
16. 2型糖尿病モデルラット GK/Jcl, 日本クレア株式会社.
http://www.clea-japan.com/animalpage/a_1/b_04.html (参照 : 2015年10月9日)
17. 2 型糖尿病モデルラット Crlj:ZUC-Lepr^{fa}, 日本チャールズ・リバー株式会社.
<http://www.crj.co.jp/product/domestic/detail/12> (参照 : 2015 年 10 月 9 日)
18. Goto Y, Suzuki K, Ono T, Sasaki M, Toyota T: Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Adv Exp Med Biol* 1988; 246: 29-31.
19. Phillips AO, Baboolal K, Riley S, Grone H, Janssen U, Steadman R, Williams J, Floege J: Association of prolonged hyperglycemia with glomerular hypertrophy and renal basement membrane thickening in the Goto Kakizaki model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2001; 37(2): 400-410.
20. Mauer S, Steffes M, Ellis E, Sutherland D, Brown D, Goetz FC: Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1984;74(4):1143-1155.
21. Riley SG, Evans RA, Davies M, Floege J, Phillips AO: Goto-Kakizaki rat is protected from proteinuria after induction of anti-Thy1 nephritis. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(5): 985-1000.

22. Riley SG, Steadman R, Williams JD, Floege J, Phillips AO: Augmentation of kidney injury by basic fibroblast growth factor or platelet-derived growth factor does not induce progressive diabetic nephropathy in the Goto Kakizaki model of non-insulin-dependent diabetes. *J Lab Clin Med* 1999; 134(3): 304-312.
23. VECTASTAIN ABCSYSTEMS, VECTOR LABORATORIES Inc.
<http://vectorlabs.com/products/immunohistochemistry/vectastain-abc-systems.html> (参照 : 2015 年 10 月 9 日)
24. Mogensen C: Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term juvenile diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1971; 28(1): 91-100.
25. Ritz E, Keller C, Bergis K: Diabetic Nephropathy of type II diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(Suppl. 9): 38-44.
26. Ziyadeh F: Renal tubular basement membrane and collagen type IV in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1993; 43(1): 114-120.
27. Rocco M, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh F: Elevated glucose stimulates TGF-beta gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 1992; 41(1): 107-114.
28. Ziyadeh F, Snipes E, Watanabe M, Alvarez R, Goldfarb S, Haverty T: High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol* 1990; 259: F704-714.
29. Bleyer AJ, Fumo P, Snipes ER, Goldfarb S, Simmons DA, Ziyadeh FN: Polyol pathway mediates high glucose-induced collagen synthesis in proximal tubule. *Kidney Int* 1994; 45(3): 659-666.
30. Groma V: Demonstration of collagen type VI and alpha-smooth muscle actin in renal fibrotic injury in man. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(2): 305-312.

31. Alpers CE, Hudkins KL, Gown AM, Johnson RJ: Enhanced expression of "muscle-specific" actin in glomerulonephritis. *Kidney Int* 1992; 41(5): 1134-1142.
32. Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, Shortland J, Brown CB, El Nahas AM: Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(1): 43-50.
33. El Nahas A, Muchaneta-Kubara E, Zhang G, Adam A, Goumenos D: Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. *Kidney Int* 1996; Suppl: S23-27.
34. Gabbiani G: The biology of the myofibroblast. *Kidney Int* 1992; 41(3): 530-532.
35. Furuta T, Saito T, Ootaka T, Soma J, Obara K, Abe K, Yoshinaga K: The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1993; 21(5): 480-485.
36. Nikolic-Paterson DJ, Lan HY, Hill PA, Atkins RC: Macrophages in renal injury. *Kidney Int* 1994; Suppl 45: S79-82.
37. Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC: The role of macrophages in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(Suppl. 5): 3-7.
38. 「経口血糖降下薬の臨床評価方法に関するガイドライン」について 薬食審査発0709第1号 平成22年7月9日.
39. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF: The Zucker rat model of obesity, insulinresistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 1992; 19(1 Suppl): I110-115.
40. Ionescu E, Sauter JF, Jeanrenaud B: Abnormal oral glucose tolerance in genetically obese (fa/fa) rats. *Am J Physiol* 1985; 248: E500-506.
41. Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA: The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 1989; 13(6 Pt2): 896-901.
42. Reaven GM: Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): An expanded definition. *Annu Rev Med* 1993; 44: 121-131.

43. Sato N, Komatsu Y, Sugai H, Hotta O, Kurumatani H: Beraprost Sodium Ameliorates Renal Tubulointerstitial Injury in Experimental Rat Glomerulonephritis. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology 2002
44. Zierath JR, Krook A, Wallner-Henriksson H: Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2000; 43: 821-835.
45. Crettaz M, Prentki M, Zaninetti D, Jeanrenaud B: Insulin Resistance in Soleus Muscle from Obese Zucker Rats. *Biochem J* 1980; 186: 525-534.
46. Dandona P, Aljada A: Advances in Diabetes for the Millennium: Diabetes and the Endothelium. *Med Gen Med* 2004; 6(3 Suppl): 6.
47. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M: Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 2006; 116(4): 1071–1080.
48. Agouni A, Lagrue-Lak-Hall AH, Mostefai HA, Tessel A, Mulder P, Rouet P, Desmoulin F, Heymes C, Martínez MC, Andriantsitohaina R: Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS One* 2009; 4(5): e5557.
49. Kuhad A, Sachdeva AK, Chopra K: Attenuation of renoinflammatory cascade in experimental model of diabetic nephropathy by sesamol. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 6123–6128.
50. Liang JH, Li YN, Qi JS, Jia XX: Peroxynitrite-induced protein nitration is responsible for renal mitochondrial damage in diabetic rat. *J Endocrinol Invest* 2009; Sep 11.
51. Kawaguchi M, Koshimura K, Sohmiya M, Murakami Y, Gonda T, Kato Y: Effect of insulin on nitric oxide synthase-like immunostaining of arteries in various organs in Zucker diabetic fatty rats. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:343-349.

52. Song D, Kuo KH, Yao R, Hutchings SR, Pang CC: Inducible nitric oxide synthase depresses cardiac contractile function in Zucker diabetic fatty rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 579(1-3): 253-259 .
53. Niwano K, Arai M, Tomaru K, Uchiyama T, Ohyama Y, Kurabayashi M: Transcriptional Stimulation of the eNOS Gene by the Stable Prostacyclin Analogue Beraprost Is Mediated Through cAMP-Responsive Element in Vascular Endothelial Cells: Close Link Between PGI₂ Signal and NO Pathways. *Circ Res* 2003; 93:523-530..
54. Niwano K, Arai M, Koitabashi N, Hara S, Watanabe A, Sekiguchi K, Tanaka T, Iso T, Kurabayashi M: Competitive Binding of CREB and ATF2 to cAMP/ATF Responsive Element Regulates eNOS Gene Expression in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1036-1042.
55. Okuda Y, Sone H, Mizutani S, Asano M, Tsurushima Y, Ogawa M, Tada K, Asakura Y, Kawakami Y, Suzuki S, Yamashita K: Acute effect of beraprost sodium on lower limb circulation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus-evaluation by color Doppler ultrasonography and laser cutaneous blood flowmetry. *Prostaglandins* 1996; 52(2): 375-384.
56. Aso Y, Tayama K, Takanashi K, Inukai T, Takemura Y: Changes in skin blood flow in type 2 diabetes induced by prostacyclin: association with ankle brachial index and plasma thrombomodulin levels. *Metabolism* 2001; 50(5): 568-572.
57. Virkamäki A, Korshennikova E, Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, Halavaara J, Häkkinen AM, Yki-Järvinen H: Intramyocellular Lipid Is Associated With Resistance to in Vivo Insulin Actions on Glucose Uptake, Antilipolysis and Early Insulin Signaling Pathways in Human Skeletal Muscle. *Diabetes* 2001; 50: 2337-2343.

58. Korach-André M, Gounarides J, Deacon R, Beil M, Sun D, Gao J, Laurent D: Age and muscle-type modulated role of intramyocellular lipids in the progression of insulin resistance in nondiabetic Zucker rats. *Metabolism* 2005; 54(4): 522-528.
59. Teachey MK, Taylor ZC, Maier T, Saengsirisuwan V, Sloniger JA, Jacob S, Klatt MJ, Ptock A, Kraemer K, Hasselwander O, Henriksen EJ: Interactions of conjugated linoleic acid and lipoic acid on insulin action in the obese Zucker rat. *Metabolism* 2003; 52(9): 1167-1174.
60. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL, and Shulman GI: Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(13): 7522-7527.
61. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, and Hotamisligil GS: Protection from obesity induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997; 389: 610-614.
62. Sartipy P and Loskutoff D J: Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(12): 7265–7270.
63. Menon RK, Grace AA, Burgoyne W, Fonseca VA, James IM, Dandona P: Muscle blood flow in diabetes mellitus. Evidence of abnormality after exercise. *Diabetes Care* 1992; 15(5): 693-695.
64. Ding Y, Vaziri ND, Coulson R, Kamanna VS, Roh DD: Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E11-E17.
65. Frisbee JC, Delp MD: Vascular function in the metabolic syndrome and the effects on skeletal muscle perfusion: lessons from the obese Zucker rat. *Essays Biochem* 2006; 42: 145-161.
66. Young ME, Leighton B: Evidence for altered sensitivity of the nitric oxide/cGMP signalling cascade in insulin-resistant skeletal muscle. *Biochem J* 1998; 329: 73-79.

67. Matsumoto K, Morishita R, Tomita N, Moriguchi I A, Yamasaki K, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T: Impaired endothelial dysfunction in diabetes mellitus rats was restored by oral administration of prostaglandin I₂ analogue. *J Endocrinol* 2002; 175:217–223.
68. Yamashita T, Shikata K, Matsuda M, Okada S, Ogawa D, Sugimoto H, Wada J, Makino H: Beraprost sodium, prostacyclin analogue, attenuates glomerular hyperfiltration and glomerular macrophage infiltration by modulating eNOS expression in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 57(3): 149-161.
69. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(26): 15924–15929.
70. Burkey BF, Dong M, Gagen K, Eckhardt M, Dragonas N, Chen W, Grosenstein P, Argentieri G, de Souza CJ: Effects of pioglitazone on promoting energy storage, not expenditure, in brown adipose tissue of obese fa/fa Zucker rats: comparison to CL 316,243. *Metabolism* 2000; 49(10): 1301-1308.
71. Nishimatsu H, Suzuki E, Takeda R, Takahashi M, Oba S, Kimura K, Nagano T, Hirata Y: Blockade of Endogenous Proinflammatory Cytokines Ameliorates Endothelial Dysfunction in Obese Zucker Rats. *Hypertension Research* 2008; 31: 737–743.
72. Schäfer A, Pfrang J, Neumüller J, Fiedler S, Ertl G, Bauersachs J: The cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant inhibits platelet activation and reduces pro-inflammatory chemokines and leukocytes in Zucker rats. *Br J Pharmacol* 2008; 154(5): 1047-1054.

73. Fujiwara K, Nagasaka A, Nagata M, Yamamoto K, Imamura S, Oda N, Sawai Y, Hayakawa N, Suzuki A, Itoh M: A Stable Prostacyclin Analogue Reduces High Serum TNF- α Levels in Diabetic Patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004; 112: 390-394.
74. Yamada M, Sasaki R, Sato N, Suzuki M, Tamura M, Matsushita T, Kurumatani H: Amelioration by beraprost sodium, a prostacyclin analogue, of established renal dysfunction in rat glomerulonephritis model. *Eur J Pharmacol* 2002; 449(1-2): 167-176.
75. Chatzipanteli K, Rudolph S, Axelrod L: Coordinate control of lipolysis by prostaglandin E2 and prostacyclin in rat adipose tissue. *Diabetes* 1992; 41(8): 927-935.
76. Lin H, Lee JL, Hou HH, Chung CP, Hsu SP, Juan SH: Molecular mechanisms of the antiproliferative effect of beraprost, a prostacyclin agonist, in murine vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 2008; 214(2): 434-441.
77. Fujiwara K, Mochida S, Ohno A, Arai M, Matsui A, Masaki N, Hirai K, Tomiya T, Yamaoka M, Nagoshi S: Use of prostaglandin I2 analog in treatment of massive hepatic necrosis associated with endothelial cell injury and diffuse sinusoidal fibrin deposition. *Dig Dis Sci* 1995; 40(1): 41-47.
78. Li Z, Rodr'iguez-Iturbe B, Ni Z, Shahkarami A, Sepassi L, Vaziri ND: Effect of hereditary obesity on renal expressions of NO synthase, caveolin-1, AKt, guanylate cyclase, and calmodulin. *Kidney Int* 2005; 68: 2766-2772.
79. Baylis C, Mitruka B, Deng A: Chronic Blockade of Nitric Oxide Synthesis in the Rat Produces Systemic Hypertension and Glomerular Damage. *J Clin Invest* 1992; 90: 278-281.
80. Whaley-Connell A, DeMarco VG, Lastra G, Manrique C, Nistala R, Cooper SA, Westerly B, Hayden MR, Wiedmeyer C, Wei Y, Sowers JR: Insulin resistance, oxidative stress, and podocyte injury: role of rosuvastatin modulation of filtration barrier injury. *Am J Nephrol* 2008; 28: 67-75.

81. Watanabe M, Nakashima H, Mochizuki S, Abe Y, Ishimura A, Ito K, Fukushima T, Miyake K, Ogahara S, Saito T: Amelioration of diabetic nephropathy in OLETF rats by prostaglandin I₂ analog, beraprost sodium. *Am J Nephrol* 2009; 30:1-11.
82. Kushiro M, Shikata K, Sugimoto H, Shikata Y, Miyatake N, Wada J, Miyasaka M, Makino H: Therapeutic effects of prostacyclin analog on crescentic glomerulonephritis of rat. *Kidney Int* 1998; 53: 1314–1320.
83. Barit D, Cooper M E: Diabetic patients and kidney protection: an attainable target. *J Hypertens* 2008; 26:S3-S7.
84. Siddiqui AH, Ali Q, Hussain T: Protective role of angiotensin II subtype 2 receptor in blood pressure increase in obese Zucker rats. *Hypertension* 2009; 53(2): 256-261.
85. Zhao X, Li LY: PPAR-alpha agonist fenofibrate induces renal CYP enzymes and reduces blood pressure and glomerular hypertrophy in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Nephrol* 2008; 28(4): 598-606.
86. de Souza C J, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, Burkey BF: Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2001; 50(8): 1863-1871.
87. Riddle MC, Schneider J: Beginning insulin treatment of obese patients with evening 70/30 insulin plus glimepiride versus insulin alone. Glimepiride Combination Group. *Diabetes Care* 1998; 21(7): 1052-1057.
88. 藤田 宜是: 腎疾患とプロスタサイクリン. *血管医学* 2006; 7(3): 73- 82.
89. Nakamoto H, Fujita T, Origasa H, Isono M, Kurumatani H, Okada K, Kanoh H, Kiriya T and Yamada S: A multinational phase IIb/III trial of beraprost sodium, an orally active prostacyclin analogue, in patients with primary glomerular disease or nephrosclerosis (CASSIOPEIR trial), rationale and study design. *BMC Nephrology* 2014; 15: 153.

90. 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方 オルメサルタン メドキシミル錠 第一三共株式会社, 2014 年6 月改訂 (第17 版)
91. 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方 テルミサルタン錠 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社, 2015年4月 (改訂第20版)
92. 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方 ロサルタンカリウム錠, MSD株式会社, 2014 年6月改訂 (改訂第18版)
93. 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方 エナラプリルマレイン酸塩錠, MSD株式会社, 2014年6月改訂 (改訂第16版)
94. 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方 カプトプリル製剤, 第一三共株式会社, 2015年3月改訂 (第11版)
95. 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方 アリスキレンフマル酸塩錠, ノバルティスファーマ株式会社, 2015 年3 月改訂 (改訂第9 版)
96. 一般社団法人 日本腎臓学会編: エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2013; 259p.

謝 辞

本博士論文の執筆にあたり、多大なご指導ならびにご鞭撻をいただいた、筑波大学
生命環境系教授中村 幸治先生、同教授王 碧昭先生、同准教授内海 真生先生、同准教
授山田 小須弥先生に謹んで感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、多大なサポートとご指導をいただきました、車
谷 元氏（東レ株式会社）、金子 正之氏（東レ株式会社）に感謝いたします。